

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

Ein neues liposomales Trägersystem für eine optimierte Antitumorthherapie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität
vorgelegt

von

Thomas Nahde

aus

Wilhelmshaven

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 12.03.2004
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. R. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. T. Gudermann

Für meine Familie.

*Wenn es einen Weg gibt, etwas besser zu machen,
finde ihn.*

Thomas A. Edison

ZUSAMMENFASSUNG	1
 1. ALLGEMEINE EINLEITUNG.....	3
1.1. Grundlagen	3
1.2. Medizinische Anwendungen von Liposomen	9
1.3. Liposomen in der Tumorthherapie	11
1.4. Auswahl und Optimierung von Liposomen für eine Antitumorthherapie	16
1.5. Zusammenfassung der Ziele dieser Arbeit	20
 2. OPTIMIERUNG VON AVE (ARTIFICIAL VIRUS-LIKE ENVELOPE) -BASIERTEN LIPOSOMALEN TRÄGERSYSTEMEN FÜR DIE SYSTEMISCHE ANTITUMORTHERAPIE	23
2.1. Einleitung	23
2.2. Ergebnisse.....	29
2.2.1. Überblick.....	29
2.2.2. Biophysikalische <i>in vitro</i> Charakterisierung	31
2.2.2.1. Größen.....	31
2.2.2.2. Zetapotentiale	32
2.2.2.3. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen	34
2.2.2.4. Lagerstabilitäten.....	35
2.2.3. Zellbiologische und biochemische <i>in vitro</i> Charakterisierung	36
2.2.3.1. Bindungsstudien.....	36
2.2.3.2. Interaktion mit Komplementfaktoren	37
2.2.3.3. Plasmainteraktion	38
2.2.4. Physiologische <i>in vivo</i> Charakterisierung	42
2.2.4.1. Kinetiken und Organverteilungen	42
2.2.4.1.1. AVE3, AVE5 und AVE14	42
2.2.4.1.2. AVE3 und AVE3 2,5 % / 5 % / 7,5 % / 10 % PEG5000	46
2.2.4.1.3. AVE7, AVE9 und AVE11	49
2.2.4.1.4. AVE7 und Decoystrategie	52
2.2.4.1.5. Einfluß des Cholesterols: AVE9 und AVE9' bis AVE9''''	55
2.2.4.1.6. Einfluß der Fettsäuren und des PE: AVE9 DPPC / DPPE / SSM und AVE9 0 % PE.....	58
2.2.4.1.7. Einfluß des SM und einer Pegylierung, Vergleich mit Standardliposomen: AVE9, AVE9 0%- 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0%SM 5 % PEG5000 und DPPC/Chol 5 % PEG5000	61
2.2.4.2. Organverteilung und Tumorakkumulation Rhodamin-markierter Liposomen.....	66
2.3. Diskussion und Ausblick.....	69
2.3.1. Diskussion	69
2.3.2. Ausblick.....	75

3. ANWENDUNG VON AVE (ARTIFICIAL VIRUS-LIKE ENVELOPE) -BASIERTEN LIPOSOMALEN TRÄGERSYSTEMEN FÜR DEN SYSTEMISCHEN TRANSPORT VON ANTHRACYKLINEN FÜR DIE SYSTEMISCHE ANTITUMORTHERRAPIE..... 76

3.1. Einleitung	76
3.2. Ergebnisse.....	84
3.2.1. Überblick.....	84
3.2.2. Biophysikalische <i>in vitro</i> Charakterisierung	86
3.2.2.1. Untersuchung der Effizienz einer Beladung mittels Remote Loading.....	86
3.2.2.2. Größen.....	89
3.2.2.3. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen	90
3.2.2.4. Lagerstabilitäten.....	92
3.2.3. Zellbiologische und physiologische <i>in vitro</i> Charakterisierung	94
3.2.3.1. Aufnahmestudien.....	95
3.2.3.2. Toxizität	96
3.2.3.3. Stabilität nach Interaktion mit humanem Plasma.....	100
3.2.4. Physiologische <i>in vivo</i> Charakterisierung	106
3.2.4.1. Kinetiken und Organverteilungen sowie Tumorakkumulation.....	106
3.2.4.2. Therapeutische Wirksamkeit.....	112
3.3. Diskussion und Ausblick.....	119
3.3.1. Diskussion	119
3.3.2. Ausblick.....	123

4. OPTIMIERUNG VON AVP (ARTIFICIAL VIRUS-LIKE PARTICLE) -BASIERTEN LIPOSOMALEN TRÄGERSYSTEMEN FÜR EINE GENTHERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN 125

4.1. Einleitung	125
4.2. Ergebnisse.....	131
4.2.1. Überblick.....	131
4.2.2. Optimierung und Charakterisierung von Transferrin-inkorporierenden AVP3.....	133
4.2.2.1. AVP3 und AVP9.....	133
4.2.2.2. AVP3-tf.....	134
4.2.2.3. Entwicklung der optimierten AVP3 ^{opt} -tf.....	135
4.2.2.4. Charakterisierung der optimierten AVP3 ^{opt} -tf	139
4.2.2.5. Interaktion der optimierten AVP3 ^{opt} -tf mit Serumproteinen	141
4.2.2.6. Spezifität der optimierten AVP3 ^{opt} -tf	144
4.3. Diskussion und Ausblick.....	146
4.3.1. Diskussion	146
4.3.2. Ausblick.....	150

5. ALLGEMEINE DISKUSSION, ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	151
5.1 Diskussion	151
5.2. Diskussion und Ausblick.....	155
 6. MATERIAL UND METHODEN.....	 158
6.1. Geräte.....	158
6.2. Allgemeine Lösungen	160
6.3. Antikörper	160
6.4. Chemikalien.....	161
6.5. Kits und Sonstiges	161
6.6. Zellkulturmedien und -lösungen sowie Kulturbedingungen.....	161
6.7. Methoden	162
6.7.1. Molekularbiologische und biochemische Methoden	162
6.7.1.1. Verwendete Bakterienstämme	162
6.7.1.2. Kultivierung und Lagerung von Bakterien	162
6.7.1.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	162
6.7.1.4. Transformation von E. Coli	163
6.7.1.5. Quantitative Plasmidisolierung	163
6.7.1.6. Quantifizierung von Plasmid-DNA	164
6.7.1.7. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	164
6.7.1.8. Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese	165
6.7.1.9. Verwendete Plasmide	165
6.7.1.10. Herstellung von Lipofectamin®-Transfektions-komplexen	166
6.7.1.11. Herstellung von Lipofectin®-Transfektionskomplexen	166
6.7.1.12. Herstellung von Superfect®-Transfektionskomplexen	167
6.7.1.13. Herstellung von AVP3/9- sowie AVP3-tf- und AVP3 ^{opt} -tf- Transfektionskomplexen	168
6.7.1.14. Proteinbestimmung	169
6.7.1.15. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	170
6.7.1.16. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	171
6.7.1.17. Gesamthämolytischer Komplementassay	172
6.7.1.18. Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie von AVP3 und AVP3 ^{opt} -tf	173
6.7.2. Zellbiologische Methoden	175
6.7.2.1. Verwendete Zellen.....	175
6.7.2.2. Präparation humaner Nabelvenenendothelzellen	175
6.7.2.3. Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	176
6.7.2.4. Luziferase Assay	177
6.7.2.5. FACS-Immunfluoreszenz	178
6.7.2.6. FACS-Bindungsstudien Rhodamin-markierter Liposomen	179
6.7.2.7. Mikroskopische Bindungsstudien Rhodamin-markierter Liposomen.....	179
6.7.2.8. FACS-Aufnahmestudien Doxorubizin-beladener Liposomen	180
6.7.2.9. Mikroskopische Aufnahmestudien Doxorubizin-beladener Liposomen	180
6.7.2.10. WST-Toxizitätsassay	181
6.7.2.11. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen	182

6.7.3. Tierexperimente	183
6.7.3.1. Haltung der Versuchstiere und Induktion intradermaler Tumore	183
6.7.3.2. Pharmakokinetik und der Organverteilung radioaktiv markierter Liposomen	183
6.7.3.3. Pharmakokinetik und Organverteilung von freiem und liposomalem Doxorubizin	184
6.7.3.4. Organverteilung Rhodamin- markierter Liposomen und Kryoschnitte	185
6.7.3.5. Tumorstadium nach Behandlung mit freiem oder liposomalem Doxorubizin.....	186
6.7.4. Pharmazeutisch-technologische Methoden	187
6.7.4.1. Säulen zur Abtrennung von Liposomen zur Größenausschlußchromatographie....	187
6.7.4.2. Abtrennung von freiem und liposomalem Doxorubizins.....	188
6.7.4.3. Untersuchung der Interaktion von Liposomen mit humanem Vollplasma.....	188
6.7.4.4. Herstellung der Liposomen	189
6.7.4.5. Einbau von Doxorubizin in die Liposomen mittels <i>Remote Loading</i>	190
6.7.4.6. Einbau von radioaktiven Markern in die Liposomen	191
6.7.4.7. Größenbestimmung mittels Photonenkorrelations-Spektroskopie	191
6.7.4.8. Messung des Zetapotentials mittels Laser Doppler Anemometrie	191
6.7.4.9. Phosphatbestimmung	193
6.7.4.10. Osmolaritätsbestimmung.....	194
6.7.4.11. HPLC-Methoden zur Bestimmung des liposomalen Doxorubizins	194
6.7.4.11.1. HPLC-Bestimmung des in Liposomen verpackten Doxorubizins	195
6.7.4.11.2. HPLC-Bestimmung des Doxorubizins aus Gewebeprobe	195
 7. LITERATUR	 197
 8. ANHANG	 220
8.1. Datentabellen	220
8.2. Abkürzungen	225
8.3. Lebenslauf	227
8.4. Akademische Lehrer	228
8.5. Danksagung	229
8.6. Ehrenwörtliche Erklärung.....	231

ZUSAMMENFASSUNG

Einer kurativen Behandlung von malignen Erkrankungen mit Chemotherapeutika stehen zum einen deren schwerwiegende Nebenwirkungen bei einer systemischen Therapie sowie zum anderen deren rasche Eliminierung aus dem Blutkreislauf entgegen. Liposomen als Wirkstoffträger können den therapeutischen Index des verpackten Inhaltsstoffes erhöhen, indem sie seine Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verringerung der Nebenwirkungen steigern. Vor diesem Hintergrund sollte ausgehend von einer in der Literatur beschriebenen Formulierung (artificial virus-like envelope, AVE; Chander und Schreier, 1992, Life Science; 50: 481-489) ein neuer liposomaler Träger für eine systemische Behandlung maligner Tumore mit dem Anthrazyklin Doxorubizin entwickelt werden.

Hierzu wurden verschiedenartige Variationen bezüglich der Lipidkomposition untersucht. Das Ergebnis dieser Studien war eine optimale Liposomenformulierung, die sich *in vitro* durch geringere Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen wie z.B. Komplementfaktoren auszeichnete. *In vivo* wurden diese Ergebnisse insbesondere durch eine lange Plasmaverweildauer der Liposomen bei gleichzeitig hoher Bioverfügbarkeit des verpackten Doxorubizins im Tumor bestätigt.

Im murinen Tiermodell zeigten diese Liposomen im direkten Vergleich mit einer bereits klinisch zugelassenen liposomalen Formulierung von Doxorubizin (DOXIL) eine höhere Wirksamkeit bei der Tumorbehandlung. Beide Formulierungen zeichnen sich durch einen hohen Cholesterolgehalt in der Liposomenmembran aus, allerdings enthält die in dieser Arbeit neu entwickelte Formulierung zusätzlich Sphingomyelin als essentiellen Bestandteil. Hierdurch wird die Liposomenmembran stabilisiert und damit ein vorzeitiges Austreten des Doxorubizins verhindert.

Abschließend sollte das von AVEs abgeleitete AVP (artificial virus-like particle)-Trägersystem (Müller *et al.*, 2001, Cancer Gene Therapy; 8: 107-

117) für eine gentherapeutische Anwendung optimiert werden. Im *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass durch die nichtkovalente Inkorporation eines Präkomplexes aus Transferrin und Protaminsulfat in die Gentransferkomplexe die spezifische Transfektionseffizienz bei gleichzeitiger Reduktion der unspezifischen Wechselwirkungen mit Serumbestandteilen deutlich gesteigert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten verdeutlichen, dass sich Liposomen auf der Grundlage der AVE-Technologie erfolgreich als universelle Träger verschiedenartiger therapeutischer Inhaltsstoffe für eine systemische Tumorthherapie einsetzen lassen.

1. Allgemeine Einleitung

"Today's medicine is at the end of the road. It can no longer be transformed, modified, readjusted. That's been tried too often. We must prepare its complete renovation."

Maurice Delort (1896-1939)

1.1. GRUNDLAGEN

Zusammensetzung, Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von Liposomen

Eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin des 21. Jahrhunderts ist die erfolgreiche Behandlung von malignen Erkrankungen. Innerhalb der letzten 50 Jahre wurden seit der ersten chemotherapeutischen Therapie im Jahre 1942 zwar deutliche Fortschritte bei der Erkennung und Behandlung von Krebs erzielt, aber neben technischen Neuerungen in Chirurgie und Radiologie blieben richtungweisende Innovationen bis vor wenigen Jahren indes aus (Gilman, 1964; Hope-Stone, 1986; Price *et al.*, 1996; Papac, 2001). Große Hoffnungen werden daher in moderne Arzneiformen gesetzt und insbesondere liposomale Formulierungen könnten den von Maurice Delort schon im letzten Jahrhundert geforderten Entwicklungssprung vollziehen, da sie zur Vermeidung der schweren systemischen Nebenwirkungen konventioneller Therapieformen Spezifität und Wirksamkeit zusammenführen.

In den Jahren nach ihrer ersten Beschreibung durch Bangham 1965 wurden Liposomen durch die verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen wie die Biochemie, die Physik oder die Chemie in erster Linie hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Modellmembranen charakterisiert (Bangham, 1968; Lasic, 1993; Bangham, 1983).

Ihr therapeutisches Potential, als biologische Trägersysteme für Arzneistoffe (*drug delivery*) deren zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen zu

vermeiden und eine Zielsteuerung (*targeting*) der inkorporierten Substanzen zu ermöglichen, wurde jedoch erst ein Jahrzehnt später erkannt und seitdem konsequent erforscht (Gregoriadis *et al.*, 1974; Gregoriadis *et al.*, 1976; Papahadjopoulos, 1978; Kane, 2001). Mittlerweile haben Liposomen Einzug gefunden in die erfolgreiche medizinische Anwendung als Träger von Diagnostika und Chemotherapeutika (Lasic, 1998) sowie in die Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie (Lasic und Barenholz 1996).

Jedoch ist bis heute ihre weitere Optimierung für eine zielgerichtete Antitumorthérapie mit Chemotherapeutika und gentherapeutische Ansätze gegen Krebs noch immer Gegenstand vorklinischer und klinischer Forschung (Lasic und Papahadjopoulos, 1998, Gregoriadis, 1999; Gregoriadis *et al.*, 2002).

Liposomen - erstmals als solche durch Sessa 1968 benannt - sind vesikuläre kolloidale Partikel, mit einem wässrigen Innenraum, umgeben von einer oder mehreren Membranen aus selbstorganisierenden amphiphilen Lipiden. Diese Membranen bilden sich spontan aus, wenn amphiphile Lipide in einem wässrigen Medium dispergiert werden, indem sich ihre hydrophoben Fettsäurereste gegeneinander ausrichten, während sich die hydrophilen Bereiche zur wässrigen Seite hin orientieren (Lasic und Papahadjopoulos, 1995).

Typischerweise bestehen Liposomen aus Phospholipiden, also Phosphoglyzeriden und Sphingolipiden, welche natürlicherweise aus Ei, Soja oder Gehirnen extrahiert oder auch synthetisch hergestellt werden (Lasic, 1997).

Phosphoglyzeride als Hauptbestandteil von Liposomen bestehen als amphiphile Moleküle aus einer hydrophoben Schwanzgruppe, bei der zwei der drei Hydroxylgruppen des Glycerins mit langkettigen Fettsäuren verestert sind. Durch die Veresterung einer Phosphorsäure mit der dritten Hydroxygruppe des Glycerols sowie der Hydroxygruppe eines Aminoalkohols, insbesondere Cholin, Ethanolamin oder Serin entsteht die hydrophile Kopfgruppe.

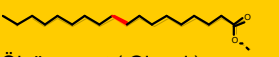


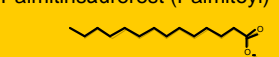
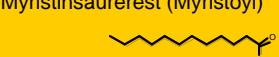
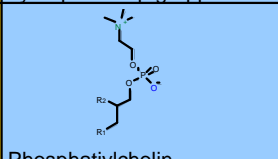
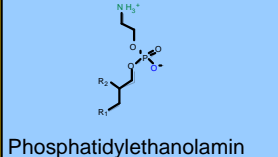
Bei den Sphingophospholipiden übernimmt Sphingosin als Amindialkohol die Aufgabe des Glycerols und eines Acylrestes. Eine weiterer hydrophober Schwanz entsteht durch die Säureamidbindung mit einer Fettsäure, der hydrophile Kopf durch die Veresterung mit Phosphorsäure.

Cholesterol als weiterer möglicher Bestandteil von Liposomen lagert sich in Liposomen zwischen die Fettsäureketten ein, wobei sich seine Hydroxylgruppen in Richtung der hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide orientieren.

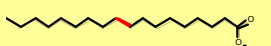
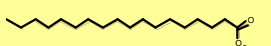
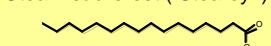
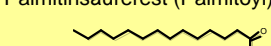
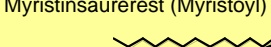
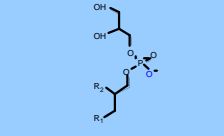
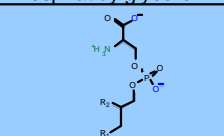
Zudem können Liposomen ebenso aus speziell synthetisierten, natürlicherweise nicht vorkommenden positiv geladenen Lipiden mit hydrophilen Kopfgruppen aus primären bis quartären sowie multivalenten Amingruppen bestehen.




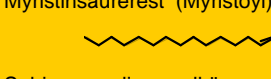
Die Lipide werden hinsichtlich ihrer Ladung bei physiologischem pH-Wert rubriziert in neutrale Lipide (Lezithine: Phosphatidylcholine, Kepheline: Phosphatidylethanolamine sowie Sphingomyelin und Cholesterol), negativ geladene Lipide (Phosphatidylserine und Phosphatidylglyzerole) und positiv geladene Lipide (synthetische Lipide wie DOTMA, DOSPA und DOTAP).

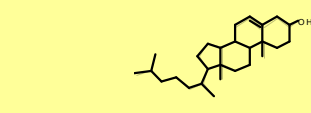
Während Lipide natürlichen Ursprungs aus verschiedenen Fettsäureketten bestehen, besitzen synthetische Lipide genau definierte Fettsäuren.



ungeladene Phosphoglyceride			
lipophile Fettsäurereste	hydrophile Kopfgruppen	Beispiele	Reste
 Ölsäurerest (Oleoyl)  Stearinsäurerest (Stearoyl)  Palmitinsäurerest (Palmitoyl)  Myristinsäurerest (Myristoyl)  Laurinsäurerest (Lauryl)	 Phosphatidylcholin  Phosphatidylethanolamin	DSPC POPC DPPE DLPE	$R_1 = R_2 = \text{Stearoyl}$ $R_1 = \text{Palmitoyl}$ $R_2 = \text{Oleoyl}$ $R_1 = R_2 = \text{Palmitoyl}$ $R_1 = R_2 = \text{Lauryl}$

Tab. 1.1. Liposomenbestandteile

negativ geladene Phosphoglyceride			
lipophile Fettsäurereste	hydrophile Kopfgruppen	Beispiele	Reste
 Ölsäurerest (Oleoyl)  Stearinsäurerest (Stearoyl)  Palmitinsäurerest (Palmitoyl)  Myristinsäurerest (Myristoyl)  Laurinsäurerest (Lauryl)	 Phosphatidylglycerol	DSPG DOPG	$R_1 = R_2 = \text{Stearoyl}$ $R_1 = R_2 = \text{Oleoyl}$
	 Phosphatidylserin	DOPS DPPS	$R_1 = R_2 = \text{Oleoyl}$ $R_1 = R_2 = \text{Palmitoyl}$

Sphingomyeline (positiv geladen)			
lipophile Fettsäurereste	hydrophiler Teil	Beispiele	Reste
 Stearinsäurerest (Stearoyl)  Palmitinsäurerest (Palmitoyl)  Myristinsäurerest (Myristoyl)  Sphingomyelingrundkörper		SSM	$R_1 = \text{Stearoyl}$

Cholesterol		
lipophiler Teil	hydrophiler Teil	
		

positiv geladene Lipide			
lipophile Fettsäurereste	hydrophile Kopfgruppen	Beispiele	Reste
 Dioleyletherrest		DOSPA DOTMA	$R_1 =$ $R_1 =$
 Diölsäurerest (Dioleoyl)		DOTAP	$R_1 =$

Tab. 1.1. (Fortsetzung) Liposomenbestandteile

Eine Möglichkeit der Liposomenherstellung stellt die Film-Hydratisierungsmethode dar: Dabei werden die verwendeten Lipide zunächst in einem organischen Lösungsmittel wie Chloroform gelöst. Durch Evaporation des Lösungsmittels in einem Rundkolben entsteht ein dünner Lipidfilm, der in einem geeigneten wässrigen Dispersionsmedium hydratisiert wird und spontan multilamellare Vesikel mit einer Größe im Mikrometerbereich ausbildet. Unilamellare Vesikel mit einer Größe im Nanometerbereich entstehen erst mittels anschließender Extrusion durch Polycarbonatmembranen.

Liposomen unterscheiden sich also hinsichtlich ihrer Größe und Lamellarität und werden daher eingeteilt in große multilamellare Vesikel (MLV, *multilamellar large vesicles*, 1-5 μm) und unilamellare Vesikel, die klein (SUV, *small unilamellar vesicles*, 0,05-0,1 μm) oder groß (LUV, *large unilamellar vesicles*, 0,1-0,25 μm) sein können (New York Academy of Science, 1977).

In Anlehnung an Martin 1997 werden sie ferner eingeteilt in konventionelle Liposomen ohne modifizierte Oberfläche sowie sterisch stabilisierte Liposomen, die z.B. durch den Einbau Polyethylenglykol-derivatisierter Lipide eine modifizierte Oberfläche besitzen.

Die vielseitigen Anwendungsbereiche von Liposomen ergeben sich aus ihrem einzigartigen Potential, hydrophile, lipophile sowie amphiphile Substanzen gleichermaßen effizient einlagern zu können.

Unilamellare Liposomen sind infolge ihres hydrophilen Innenraumes idealerweise geeignet, um hydrophile Inhaltsstoffe aufzunehmen (New, 1989). Lipophile Inhaltsstoffe lassen sich hingegen in die ebenfalls lipophilen Phospholipiddoppelmembranen zwischen den hydrophoben Fettsäureketten einlagern. Daher eignen sich zu diesem Zweck insbesondere multilamellare Liposomen (Leyland-Jones 1993). Amphiphile oder geladene Moleküle lassen sich an der Membranoberfläche bei geeigneter Lipidwahl adsorbieren (Hamann und Nothelle, 1996).

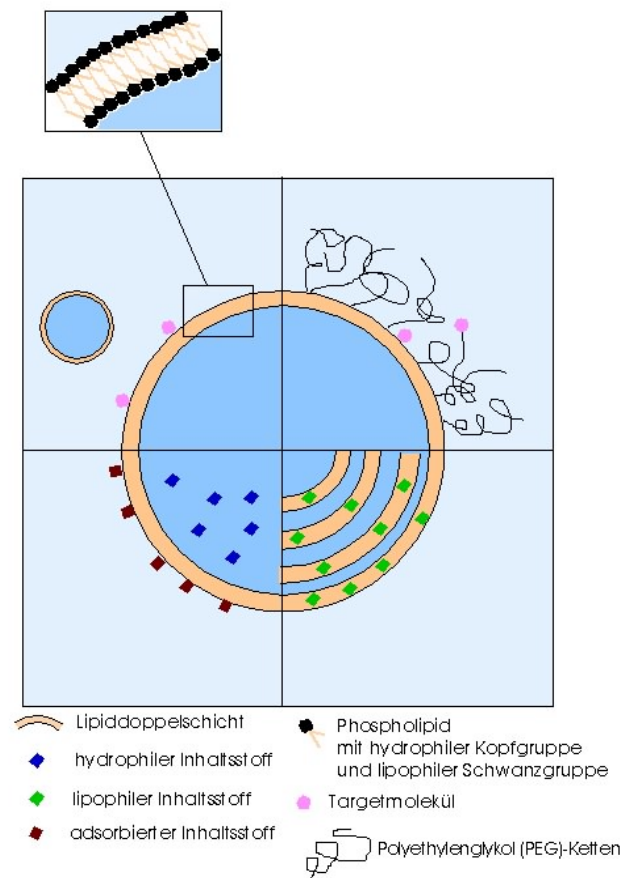


Abb. 1.1. Aufbau von Liposomen

Durch ihre Zusammensetzung aus natürlicherweise in Zellmembranen vorkommenden Bestandteilen sind Liposomen metabolisierbar und daher untoxisch sowie infolge ihres Potentials sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen effizient zu verpacken, ideal geeignet für einen systemischen Arzneimitteltransport (Forssen *et al.*, 1998). Hierbei lässt sich insbesondere der Transport von Chemotherapeutika (*drug delivery*) (Gabizon und Martin, 1997) sowie Zytokinen (Alving, 1991; Konno, *et al.*, 1991), der Transport von Adjuvantien und Vakzinen zur Immunstimulierung und Vakzinierung (Allison und Gregoriadis, 1974; Gregoriadis und Florence, 1991) sowie der Transport genetischer Information in Form von DNA (*gene delivery*) (Templeton, 2002) unterscheiden.

1.2. MEDIZINISCHE ANWENDUNGEN VON LIPOSOMEN

Liposomale Arzneimittel zur topischen und parenteralen Anwendung in der medizinischen Praxis

1972 konnten Gregoriadis und Ryman erstmals zeigen, dass Liposomen Substanzen effizient verpacken und nach i.v. Injektion in Leberzellen transportieren können.

Heute werden Liposomen im kosmetischen und pharmazeutischen Bereich als Wirkstoffträger insbesondere für hydrophile und lipophile Substanzen eingesetzt (Müller und Hildebrand, 1998), um die Nebenwirkungen zu vermeiden, die bei parenteraler medizinischer Anwendung der unverpackten, freien Substanz auftreten.

Bei einer topischen Anwendung können Liposomen die transepidermale Permeation verstärken, ohne dass sie den systemischen Kreislauf erreichen (Mezei und Gulasekharam, 1982; Wohlrab und Lasch, 1989).

So ist Pevaryl®-Lipogel liposomal verpacktes lipophiles Econozol zur lokalen Behandlung von Pilzerkrankungen der Haut, welches eine doppelt so hohe Eindringtiefe in die Haut und höhere Wirksamkeit im Vergleich zu freiem Econozol aufweist (Neff, 1996).

Bei Heparin-Pur® handelt es sich um eine liposomale Formulierung von hydrophilem Heparin zur Behandlung von Blutergüssen. Gegenüber nichtliposomalen Formulierungen wird eine deutliche Verbesserung der Mikrozirkulation der Haut infolge eines tieferen Eindringens des Heparins erreicht (Artmann *et al.*, 1997).

Bei einer parenteralen Anwendung kann durch die Verkapselung eines hydrophilen Arzneimittels im Innenraum der Liposomen seine Plasmahalbwertszeit verlängert, seine Konzentration in den Zielorganen deutlich erhöht und seine schnelle Verstoffwechselung durch die Leber verhindert werden. Die Liposomen haben hierbei eine Depotwirkung mit kontrollierter Freisetzung, so dass lokale hohe Konzentrationen,

insbesondere in gesunden Organen gar nicht erst auftreten und hierdurch hervorgerufene Nebenwirkungen vermieden werden können.

Bei Doxil® und DaunoXome® handelt es sich um liposomale Formulierungen der Anthrazykline Daunorubizin, bzw. Doxorubizin, die bereits in der Klinik für die erfolgreiche Behandlung des Kaposi-Sarkoms und von Brust- und Ovarialkarzinomen sowie weiterer solider Tumore eingesetzt werden (Lasic, 1996; Forssen und Ross, 1994; Forssen *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1995; Goebel *et al.*, 1996).

AmBisome® sind Liposomen mit verpacktem lipophilen Amphotericin B, zur klinischen Behandlung schwerer parasitärer Erkrankungen des mononukleären phagozytotischen Systems (Lasic, 1998). Die sonst eher unerwünschte Elimination von konventionellen Liposomen durch die Kupfferzellen der Leber und die Makrophagen der Milz wirkt sich hier vorteilhaft aus. Die verminderte Nephrotoxizität ergibt sich zum einen aus der leberschützenden Wirkung des Phosphatidylcholins (Martin und Marriott, 1981) sowie zum anderen aus der stabilen Inkorporation des Amphotericins infolge einer Ladungswechselwirkung mit dem Membranlipid Phosphatidylglyzerin (Taylor *et al.*, 1982; Tollemar und Ringdén, 1995).

Die liposomale Verpackung von Rifampicin zur Behandlung von Tuberkulose erhöht im Mausmodell seine Wirksamkeit (Deol *et al.*, 1997), wobei gleichzeitig seine Toxizität reduziert werden kann (Deol und Khuller, 1997).

Bereits 1974 erkannten Allison und Gregoriadis das Potential von Liposomen für eine Immuntherapie. Demnach können Liposomen als Träger von Antigenen (Gregoriadis, 1995) und Zytokinen (Hockertz *et al.*, 1991; Gregoriadis *et al.*, 1996) eine Immunantwort verstärken.

Bei Epaxal-Berna® handelt es sich um in die Lipidmembran eingelagerte inaktivierte Hepatitis A Virionen und Influenza-Hämagglutinine als Adjuvantien zur Impfung gegen Hepatitis A (Loutan *et al.*, 1994; Glück *et al.*, 1994; Ambrosch *et al.*, 1997). Weitere liposomale Formulierungen zur

Immunisierung gegen Influenza, Hepatitis B sowie Diphtherie und Tetanus befinden sich derzeit in klinischer Evaluation (Lasic, 1998).

Produkt	Inhalt	Löslichkeit	Anwendungsform	Firma/ Institut
Pevaryl®-Lipogel	Econazol	lipophil	topisch	Janssen-Cilag AG
Heparin-PUR®	Heparin	hydrophil	topisch	Ratiopharm
Doxil®	Doxorubizin	hydrophil	parenteral	Sequus
DaunoXome®	Daunorubizin	hydrophil	parenteral	NeXstar
AmBisome®	Amphotericin B	lipophil	parenteral	NeXstar
Epaxal-Berna®	inaktivierte Hepatitis A Virionen, Hämagglutinine	hydrophil	parenteral	Schweizerisches Serum- und Impfinstitut

Tab. 1.2. Liposomale Arzneimittel für die topische und parenterale Anwendung

1.3. LIPOSOMEN IN DER TUMORTHERAPIE

Grundlagen der Tumorthherapie; Voraussetzungen für eine liposomale Chemo- und Gentherapie

Im Jahre 2001 sind nach Angaben des statistischen Bundesamtes allein in Deutschland knapp 80.000 Menschen an bösartigen Neubildungen der Lunge, des Darmes oder der Brust gestorben. Krebs ist somit nach Erkrankungen des Herzens die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland, URL: <http://www.statistik-bund.de>, Stand 20.05.2003).

Die drei medizinischen Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs sind in Abhängigkeit von der Art des Tumors und des befallenen Organs sowie dem Grad der Metastasierung die chirurgische Entfernung, die Radiotherapie und die Chemotherapie (Price *et al.*, 1996).

Bei der chirurgischen Entfernung insbesondere kleiner solider Tumore werden neben dem befallenen Gewebe die umgebenden Lymphknoten entfernt, um auszuschließen, dass der Tumor bereits metastasiert hat. Da bereits der Verbleib weniger Tumorzellen zur Etablierung neuer Tumore führen kann, werden meist große Gewebereiche mit entsprechend schwerwiegenden Folgen entfernt (Wilmanns *et al.*, 2000).

Konnte das Tumorgewebe nicht vollständig entfernt werden oder hat eine Metastasierung bereits eingesetzt, so werden Chemo- und Radiotherapie eingesetzt, um die verbliebenen Tumorzellen abzutöten. Da die parenterale systemische Chemotherapie mit Zellzyklus-inhibierenden Arzneimitteln und die Radiotherapie jedoch nicht nur tumorigene, sondern auch gesunde Gewebe treffen, ist deren erfolgreicher Einsatz in der Tumorthherapie limitiert. Grund hierfür ist die zwar tumorselektive, jedoch nicht tumorspezifische Wirkungsweise, einhergehend mit den schwerwiegenden bekannten Nebenwirkungen wie die Induktion weiterer Tumore, Schädigung des blutbildenden Systems, Haarausfall sowie Leber- und Nierenschädigungen (Eckhardt *et al.*, 1981).

Bereits Paul Ehrlich forderte daher schon 1906 für eine ideale Therapie den Wirkstoff zielgerichtet zu den erkrankten Organen zu transportieren. Optimale systemische Trägersysteme für Arzneimittel müssen ferner metabolisierbar und untoxisch sein (Forssen *et al.*, 1998). Eben diese Forderungen erfüllen Liposomen als systemische Träger von chemotherapeutischen Arzneimitteln (*drug delivery*), indem sie durch die Veränderung der pharmakokinetischen Parameter und der Organverteilung der verpackten Substanz, deren Toxizität verringern und die therapeutische Wirkung erhöhen (Gregoriadis, 1988).

In diesem Zusammenhang ist die klinische Tumorthherapie mit liposomalen Anthrazyklinen wie Doxorubizin, Daunorubizin und Mitoxantron besonders erfolgversprechend, da diese gegen eine Vielzahl solider Tumore und Leukämien wirksam sind (Young *et al.*, 1981).

Limitierender Faktor einer Chemotherapie mit freien Anthrazyklinen ist die induzierte kumulative Kardiotoxizität mit schweren irreversiblen Spätfolgen (Minow *et al.*, 1975). Die maximale Lebenszeitdosis von Doxorubizin wird durch Risikofaktoren wie den Einsatz von Radiotherapie oder kardiotoxischen Arzneimitteln weiter reduziert (Wilmanns *et al.*, 2000). Durch die Depotwirkung infolge liposomaler Verpackung mit kontrollierter Freisetzung des verpackten Inhaltsstoffs kann eine kurzfristig auftretende

und mitunter hohe lokale Plasmakonzentration der zytotoxischen Chemotherapeutika sowie eine extravasale Schädigung des myokardialen Gewebes und anderer chemosensitiver gesunder Organe vermieden werden (Mayhew und Papahadjopoulos, 1983; Legha *et al.*, 1982).

Erste klinische Studien mit liposomalem Doxorubizin zeigten, welche Eigenschaften Liposomen für eine erfolgversprechende Antitumorthherapie erfüllen müssen (Gabizon *et al.*, 1994). Zunächst müssen die Tumorzellen möglichst lange einer möglichst hohen Dosis des Chemotherapeutikums ausgesetzt sein (Livingston, 1994). Da insbesondere seine kardiotoxischen sowie myelosuppressiven Eigenschaften die erforderliche Therapiedosis restringieren, kann freies Doxorubizin maximal bis zu einer kumulativen Dosis von 450 mg/m² eingesetzt werden (Rinehart *et al.*, 1974; Marsh, 1976, Wilmanns *et al.* 2000). Durch die Verpackung in liposomaler Form kann zwar per se die Kardiotoxizität vermieden werden (Rahman *et al.*, 1980; Gabizon, 1982), jedoch muss für eine therapeutische Wirksamkeit in den Liposomen eine hohe Konzentration von Doxorubizin erreicht werden (Gabizon *et al.*, 1998). Daher ist eine spezielle Methode zur Verpackung entwickelt worden: Bei dieser als *remote loading* bezeichneten Methode werden schwach basische Substanzen wie Doxorubizin oder Daunorubizin mittels eines Transmembran-pH-Gradienten nachträglich in fertige Liposomen eingeschleust. Die zu verpackende Substanz liegt hierfür bei dem neutralen pH des umgebenden Dispersionsmediums in einer ladungsneutralen Form vor, um dem Konzentrationsgefälle folgend durch die Liposomenmembran ins Liposomeninnere diffundieren zu können, in dem sie dann in eine geladene hydrophile Form umgewandelt und somit am Austritt aus dem Vesikel zurück durch die Membran gehindert wird. Somit kommt es zu einer Akkumulation des zu verkapselnden Stoffes im wässrigen Liposomeninneren (Lasic *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1990).

Das verpackte Chemotherapeutikum muss zudem stabil in die Liposomen verpackt sein, um ein vorzeitiges Austreten aus dem Liposom (*leakage*) zu verhindern (Gabizon, 1988).

Da das versorgende Blutgefäßsystem von Tumoren infolge seiner irregulären Morphologie mit fehlender Basalmembran besonders durchlässig ist (Dvorak *et al.*, 1988; Konerding *et al.*, 1989; Jain, 1988; Jain, 1994; Hashizume *et al.*, 2000) können insbesondere Liposomen, die lange zirkulieren und kleiner als 100 nm sind, in das Tumorgewebe eindringen (Wu *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1994) und dort aufgrund der fehlenden Lymphdrainage akkumulieren (passive Zielsteuerung, *passive targeting*) (Baxter und Jain, 1991). Im Tumor selbst muss dann eine Freisetzung des verpackten Inhaltsstoffs oder eine Aufnahme der Liposomen erfolgen (Drummond *et al.*, 1999).

Die Zirkulationsdauer der Liposomen hängt von der Interaktion mit Plasmaproteinen (Black und Gregoriadis, 1976) sowie der Aufnahme durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems ab (Moghimi und Patel, 1998, siehe hierzu insbesondere auch Abschnitt 2.2.3. und Abschnitt 2.2.4.). Insbesondere durch Variationen der Liposomenzusammensetzung (Gabizon *et al.*, 1988; Gabizon *et al.*, 1990), als auch durch eine Modifikation der Liposomenoberfläche z.B. mittels Einbau glykosylierter (Allen und Chonn, 1987) oder Polyethylenglykol-modifizierter Lipide (Klibanov *et al.*, 1990) soll eine derartige Interaktion vermieden werden, um die Plasmahalbwertszeit der Liposomen zu verlängern (s. hierzu insbesondere Abschnitt 2.2.4.).

Eine weitere Alternative zu den erwähnten konventionellen Therapieformen von Krebs ist zudem die Gentherapie (Farzaneh *et al.*, 1998; McCormick, 2001). Maligne Erkrankungen haben ihre Ursache in mutierten Genen, so dass eine konventionelle chemotherapeutische Therapie die Erkrankung zwar behandeln, nicht jedoch ihre eigentlichen Ursachen beseitigen kann, zumal sich nicht wenige Tumorarten einer erfolgreichen Behandlung infolge einer schnellen Resistenzentwicklung entziehen. Die Gentherapie vermag die Erkrankung ursächlich zu behandeln, indem mittels Substitution dysfunktioneller Gene durch funktionelle Gene die Funktion des defekten Gens wieder hergestellt oder die Zelle mit einer neuen therapeutischen

Funktion ausgestattet wird (Jain, 2001). Bei der somatischen Gentherapie sollen diese genetischen Funktionen nur in bestimmte Körperzellen, nicht jedoch in die Zellen der Keimbahn gelangen (Mountain, 2000; Scollay, 2001). Einer der Ansätze der Gentherapie gegen Krebs umfasst die *enzymregulierte Pro-Drug Therapie*, bei der die transfizierten, also neu eingeführten Gene für Enzyme kodieren, die spezifisch eine inaktive Vorstufe des Therapeutikums (*pro-drug*) in seine aktive hochwirksame Form (*drug*) konvertieren (Aghi *et al.*, 2000; Heine *et al.*, 2001). Hierbei kann es zu sogenannten "Bystander Effekten" kommen, d.h. auch nicht transfizierte Tumorzellen werden durch das aktive Therapeutikum abgetötet (Rigg und Sikora, 1997). Bei der *Immuntherapie* soll die Immunogenität des Tumors erhöht werden, um die körpereigene antitumorale Abwehr zu aktivieren (Spack und Sorgi, 2001). Die *antiangiogene Tumorthherapie* zur Zerstörung des tumorversorgenden Blutgefäßsystems ist vermutlich eine der vielversprechendsten Therapien der Zukunft (Augustin, 1998; Saaristo *et al.*, 2000; Griffioen und Molema, 2000; Boehm-Viswanathan, 2000).

Der Erfolg einer gentherapeutischen Behandlung hängt insbesondere vom effizienten sowie spezifischen Transfer der genetischen Information (*gene delivery*) in das betroffene Gewebe *in vivo* ab. Es werden hierfür virale und nichtvirale Gentransfervehikel, Vektoren genannt, unterschieden (Anderson, 1998). Die wichtigsten Virusarten, die modifiziert vorklinisch und klinisch untersucht werden sind Retroviren (Han *et al.*, 1995), Adenoviren (Benihoud *et al.*, 1999) und Adeno-assoziierte Viren (Monohan und Samulski, 2000). Die wichtigsten nichtviralen Gentransfersysteme für eine systemische Gentherapie *in vivo* sind Liposomen-DNA-Komplexe (*Lipoplexe*), Polymer-DNA-Komplexe (*Polyplexe*) sowie Liposomen-Polymer-DNA-Komplexe (*Lipopolyplexe*) (Felgner *et al.*, 1997).

Für ein optimales *gene delivery System* gelten ähnliche Forderungen wie für ein *drug delivery System*: es muss sicher, untoxisch und einfach in der Anwendung sein, eine möglichst hohe Expression des therapeutischen Gens sowie eine hohe und gleichermaßen spezifische Transfereffizienz

bedingen. Letzteres soll insbesondere durch die Verwendung zielgesteuerter Vektoren (*transductional targeting*) (Nettelbeck *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001) sowie die Verwendung gewebsspezifischer Expressionskonstrukte (*transcriptional targeting*) (Nettelbeck *et al.*, 2000) oder deren Kombination (Reynolds *et al.*, 2001; Nahde *et al.*, 2001) erreicht werden.

Die Probleme viraler Vektoren in der Gentherapie, wie z.B. die Entstehung replikationskompetenter Viren, die zufällige Integration der viralen genetischen Information in das Wirtsgenom, die Induktion einer Immunantwort und die dadurch oft limitierte Anzahl von Wiederholungen der Behandlung sowie die limitierte Größe der therapeutischen Transgene machen nichtvirale Vektoren zu der richtungsweisenden Alternative für eine gentherapeutische Anwendung schlechthin (Templeton und Lasic, 1999; Li und Huang, 2000). Für eine derartige Therapieform eignen sich besonders liposomale Systeme, da sie unterschiedliches genetisches Material wie Plasmid-DNA, Oligonukleotide sowie Ribozyme verpacken können (Tseng und Huang, 1998) und sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften z.B. durch Variationen der Lipidzusammensetzung oder ihrer Oberflächengestaltung besonders leicht modifizieren lassen (Niidome und Huang, 2002).

Die Effizienz liposomaler *gene delivery* Systeme hängt wie bereits oben für liposomale *drug delivery* Systeme beschrieben insbesondere von ihrer Stabilität in physiologischen Flüssigkeiten wie z.B. Blut ab (Li *et al.*, 1999). Die rasche Destabilisierung der Komplexe durch Opsonisierung sowie die Eliminierung durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems und eine eingeschränkte Zielsteuerung stehen einer erfolgreichen therapeutischen Anwendung entgegen (Litzinger *et al.*, 1996).

Es ist also evident, dass eine erfolgreiche Anwendung von Liposomen für ein therapeutisches *drug delivery* und *gene delivery* einer besonders sorgfältigen Auswahl und Optimierung von Liposomenformulierungen bedarf (Ulrich, 2002).

1.4. AUSWAHL UND OPTIMIERUNG VON LIPOSOMEN FÜR EINE ANTITUMORTHERAPIE

Probleme systemischer Anwendungen von Liposomen; von konventionellen Liposomen zum Konzept lang zirkulierender sterisch stabilisierter Liposomen; Zielsteuerung von Liposomen

Die Eliminierung liposomaler Arzneimittel aus der Blutzirkulation ist insbesondere durch die Freisetzung aus dem Liposom (*leakage*) (Langner, 2000) sowie die Aufnahme von Liposomen durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems (*clearance*) (Moghimi und Patel, 1998) determiniert.

Die Opsonisierung insbesondere konventioneller Liposomen durch Plasmaproteine sowie die Interaktion mit Lipoproteinen hoher und geringer Dichte resultiert zum einen in einer Destabilisierung der Liposomen mit der Folge des Austretens des verpackten Inhaltsstoffes und zum anderen in einer Aufnahme durch Gewebemakrophagen in Leber, Milz und Lunge (Gabizon *et al.*, 1982; Senior, 1987). Hierdurch kann zwar die Kardiotoxizität verpackter Anthrazykline deutlich reduziert werden, durch die Sequestrierung in Makrophagen vermindert sich jedoch auch die Wirksamkeit, da die therapeutische Plasmakonzentration deutlich erniedrigt wird (Olson *et al.*, 1982). Frühe Studien über die Tumorlokalisation von Daunorubizin, das in kleine unilamellare Liposomen verpackt worden war, zeigten, dass konventionelle Liposomen für ein erfolgreiches *drug delivery* klein sein müssen und aus ungesättigten Lipiden mit einem hohen Cholesterolgehalt bestehen sollten (Forssen *et al.*, 1992). Dies führte in der Folge zur Entwicklung der liposomalen Formulierung DaunoXome®, die gegenüber freiem Daunorubizin eine mehr als fünffach verlängerte initiale Plasmahalbwertszeit besitzt (Forssen *et al.*, 1996). Ebenfalls erwiesen sich konventionelle Liposomen mit verpacktem Mitoxantron in vorklinischen Studien weniger toxisch und insbesondere bei hohen Konzentrationen effektiver als freies Mitoxantron (Chang *et al.*, 1997). Die Notwendigkeit,

hohe Konzentrationen infolge der Aufnahme durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems einsetzen zu müssen sowie die entsprechend toxischen Wirkungen für diese Zellen (Storm *et al.*, 1993) führte zu der Entwicklung einer neuen Art von Liposomen, die anders als konventionelle Liposomen, eine modifizierte Oberfläche besitzen.

1975 konnten Durocher *et al.* zeigen, dass die dichte Glykokalyx auf Erythrozyten ihre Lipidmembran mit einem hydrophilen Mantel umgibt, der sie vor einer vorzeitigen Opsonisierung durch Plasmaproteine sowie einer Aufnahme durch die Kupfferzellen der Leber bewahrt. Diese Erkenntnis führte in der Folge zu den ersten sterisch stabilisierten Liposomen mit einer durch den Einbau des Monosialogangliosids GM1 veränderten Oberfläche (Allen und Chonn, 1987). Zwar verlängerte GM1 die Plasmahalbwertszeit von Liposomen deutlich; die Notwendigkeit, es aus Rinderhirnen extrahieren zu müssen, führte im Schatten der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (Tarkkanen und Haltia, 1980) jedoch zur Entwicklung von Liposomen mit Polyethylenglykol-derivatisierten Lipiden mit einer weiter verlängerten Plasmahalbwertszeit (Klibanov *et al.*, 1990; Papahadjopoulos *et al.*, 1991), die im weiteren als Stealth®-Liposomen bezeichnet wurden (Gabizon *et al.*, 1994). Das Polyethylenglykol auf der Oberfläche rüstet die Liposomen aus mit einer schützenden hydrophilen Hülle - ähnlich der Glykokalyx der Erythrozyten - und führt somit zu einer reduzierten Aufnahme durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems, so dass es im Rahmen einer therapeutischen Anwendung zu geringeren Leberschäden gegenüber konventionellen Liposomen kommt (Williams *et al.*, 1993). Die deutlich verlängerte initiale Plasmahalbwertszeit von etwa 5 Stunden gegenüber der von konventionellen Liposomen von 30 Minuten (Klibanov *et al.*, 1990) ermöglicht höhere Plasmakonzentrationen verpackter Anthrazykline über einen längeren Zeitraum und resultiert im Mausmodell in einer therapeutischen Wirksamkeit gegenüber zahlreichen Tumorarten wie Lymphomen (Gabizon, 1992) sowie Kolon- (Huang *et al.*, 1992), Prostata- (Vaage *et al.*, 1994), Pankreas- (Vaage *et al.*, 1997), Lungen- (Williams *et al.*, 1993) und Brustkarzinomen (Vaage *et al.*, 1993). Die klinische Relevanz

zeigt sich insbesondere durch die erfolgreiche Behandlung des AIDS-induzierten Kaposi-Sarkoms durch die pegylierte liposomale Doxorubizin-Formulierung Doxil® (Harrington *et al.*, 2000).

Auch für ein *gene delivery* mittels Liposomen gelten die obigen Restriktionen, insbesondere die Opsonisierung positiv geladener Liposomen aus natürlicherweise nicht vorkommenden kationischen Lipiden (s. Tab. 1.1.) durch Plasmaproteine mit anschließender Elimination der Komplexe durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems in Leber, Milz und Lunge (Tseng und Huang, 1998; Dash *et al.*, 1999; Ogris und Wagner, 2002).

Erfolgreiches *drug delivery* und *gene delivery* müssen zudem eine hohe Spezifität für das maligne Gewebe aufweisen, um die Schädigungen gesunden Gewebes zu minimieren. Zwar kann die Pegylierung von Liposomen zu einer langen Plasmahalbwertszeit und infolge des durchlässigen Blutgefäßsystems in Tumoren (Jain, 2001) zu einer Akkumulation im Tumor führen (*passive targeting*) (Allen *et al.*, 1991), aber für eine deutliche Reduktion der therapeutisch notwendigen Dosis zur Verringerung der Nebenwirkungen bedarf es jedoch einer Zielsteuerung der Liposomen und Komplexe (*active targeting*) (Park, 2002). Für diesen Zweck ist insbesondere die Inkorporation von Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene (Maruyama *et al.*, 1990), Lektinen (Hutchinson und Jones, 1988) sowie Glykoproteinen (Saitao *et al.*, 1988) untersucht worden. Die negative Ladung von Proteinen wie Transferrin sowie der Umstand, dass es sich um körpereigene Plasmaproteine handelt, kann Liposomen und Komplexe mit einer zusätzlichen hydrophilen mimetischen Hülle versehen, so dass es neben der Zielsteuerung zudem zu einer verlängerten Plasmahalbwertszeit kommt (Wagner *et al.*, 1994; Ogris *et al.*, 1999; Kircheis *et al.*, 2001).

Ein wirksames *drug delivery* und *gene delivery* ist zum einen an eine ausreichend lange Plasmaverweildauer und zum anderen an die

Akkumulation im erkrankten Gewebe sowie die Aufnahme des Zytostatikums oder des genetischen Materials gebunden. Eben diese Parameter gilt es somit für eine erfolgreiche zielgesteuerte liposomale Chemo- oder Gentherapie zu optimieren (Harrington *et al.*, 2000; Spack und Sorgi, 2001).

1.5. ZUSAMMENFASSUNG DER ZIELE DIESER ARBEIT

Entwicklung und Optimierung von Liposomen hinsichtlich Plasmahalbwertszeit, Bioverfügbarkeit und Zielspezifität für eine wirksame Chemo- und Gentherapie maligner Erkrankungen

Das Ziel einer kurativen chemotherapeutischen Behandlung maligner Erkrankungen ist die Heilung des Patienten. Bei allen Zytostatika führt die therapeutische Anwendung jedoch zu einem zu schweren toxischen Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression, Immunsuppression, Alopezie sowie Übelkeit und Erbrechen, zum anderen zu ernststen langfristigen Organschäden wie Kardiomyopathie, Niereninsuffizienz oder Neuropathie. Zudem sind therapeutisch wirksame Plasmakonzentrationen infolge ausgeprägter renaler und hepatischer Elimination an wiederholte und langwierige Anwendungen gebunden (Price *et al.*, 1996; Wilmanns *et al.*, 2000).

Hingegen reduzieren liposomale Formulierungen verpackter Chemotherapeutika deren Nebenwirkungen dramatisch und ermöglichen hohe therapeutische Dosen über eine lange Zeit infolge einer Verlängerung der Plasmahalbwertszeit des Inhaltsstoffs (Gregoriadis, 1988). Konventionelle Liposomen werden jedoch innerhalb weniger Minuten nach intravasaler Applikation infolge Opsonisierung durch Plasmaproteine und Aufnahme durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems eliminiert. Durch die Modifikation der Liposomenoberfläche mit hydrophilen Polymeren wie Polyethylenglykol können Opsonisierung und Aufnahme

inhibiert und somit die Elimination solcher sterisch stabilisierter Liposomen unterdrückt werden (Gabizon *et al.*, 1998).

Insbesondere die Bioverfügbarkeit, also das Ausmaß in dem der Wirkstoff nach intravasaler Applikation freigesetzt wird und am erkrankten Gewebe verfügbar ist, beeinflussen die Wirksamkeit des eingesetzten Chemotherapeutikums. Gerade sterisch stabilisierte Liposomen mit langer Plasmahalbwertszeit reduzieren jedoch die Bioverfügbarkeit des Inhaltsstoffs, da sie zwar den Inhaltsstoff effizient verpacken, aber nur ungenügend am Wirkort freigeben und eine Aufnahme der Liposomen reduzieren. Zudem wird infolge des zufallsbedingten Einbaus des hydrophilen Polymers auf der Innenseite der Liposomenmembran der hydrophile Innenraum der Liposomen verkleinert, so dass ihr Verpackungsvermögen hinter dem konventioneller Liposomen zurückbleibt (Drummond *et al.*, 1999).

Im Abschnitt 2 galt es daher, ausgehend von einer bereits charakterisierten Liposomenformulierung deren Halbwertszeit für eine wirksame *in vivo* Anwendung zu optimieren. Da die Liposomenzusammensetzung für eine *in vivo* Anwendung insbesondere dahingehend optimiert werden sollte, die Vorteile sterisch stabilisierter Liposomen - also lange Plasmahalbwertszeit bei verminderter Aufnahme durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems - mit den Vorzügen konventioneller Liposomen - also kontrollierter Freisetzung des Inhaltsstoffs aus dem Liposomen sowie größerem hydrophilen Innenraum - zu kombinieren, folgte im Abschnitt 3 die Untersuchung ihres Vermögens, Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubizin effizient und stabil zu verpacken.

Im xenogenen Tiermodell sollten diese optimierten Liposomen schließlich mit einer konventionellen Chemotherapie mit freiem und bereits klinisch eingesetztem liposomalen Doxorubizin verglichen werden.

Da einige Tumorarten häufig chemotherapieresistent sind, sollte im Abschnitt 4 abschließend der Ansatz einer gentherapeutischen Behandlung mit Liposomen untersucht werden. Insbesondere die

transduktionale Zielspezifität sollte mittels Transferrin-inkorporierender Lipopolyplexe für eine mögliche *in vivo* Anwendung optimiert werden.

2. Optimierung von AVE (artificial virus-like envelope) -basierten liposomalen Trägersystemen für die systemische Antitumorthherapie

2.1. EINLEITUNG

Mechanismen und Determinanten der Elimination von Liposomen aus der Blutzirkulation als Ansätze für eine Optimierung mit dem Ziel einer verlängerten Plasmaverweildauer

Einer wirksamen chemotherapeutischen Behandlung von malignen Erkrankungen mit Anthrazyklinen stehen zum einen deren kurze Plasmaverweildauer infolge rascher hepatischer und renaler Eliminierung sowie zum anderen deren schwerwiegende Nebenwirkungen bei einer systemischen Anwendung entgegen (Sauer, 1998).

Liposomen verändern die pharmakokinetischen Parameter des verpackten Inhaltsstoffs, indem sie seine rasche Metabolisierung und Elimination verhindern (Gregoriadis und Neerunjun, 1974; Namba und Oku, 1993). Zudem wird eine Gewebeschädigung gesunder Organe durch die modifizierte Gewebeverteilung liposomal verpackter Chemotherapeutika vermieden, so dass höhere therapeutische Dosen eingesetzt werden können (Van Hoesel *et al.*, 1984; Wilmanns, 2000). Die Elimination liposomaler Chemotherapeutika wird zum einen durch ihre Freisetzung aus dem Liposom bestimmt (*leakage*) (Langner, 2000), zum anderen durch die Aufnahme der Liposomen durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems (*clearance*) (Moghimi und Patel, 1998).

Nach intravasaler Applikation interagieren Liposomen zunächst mit Lipoproteinen und Serumproteinen. Insbesondere der Lipidtransfer vom Liposom auf Lipoproteine hoher und geringer Dichte (Allen, 1981; Shahrokh und Nichols, 1982) sowie die Penetration durch Bestandteile der Lipoproteine wie ApoA-1 (Wetterau und Jonas, 1983) und ApoE (Williams *et*

al., 1987) oder Serumproteine wie Albumin, Fibronectin oder beta2-Glykoprotein-I (Scherphof *et al.*, 1984; Bonte und Juliano, 1986; Chonn *et al.*, 1995) destabilisieren die Liposomenmembran. Weitere sogenannte Opsonine (Patel, 1992) wie Immunglobuline (Derksen *et al.*, 1988; Chonn *et al.*, 1992), C-reaktives Protein (Mold und Gewurz, 1981) oder frühe Proteine der Komplementkaskade wie C3 und C5 (Funato *et al.*, 1992) markieren die Liposomen als körperfremd für die Rezeptor-vermittelte Erkennung und Aufnahme durch aktivierte phagozytierende Zellen, insbesondere Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten (Scieszka *et al.*, 1991).

Insbesondere die Bindung von natürlicherweise vorkommenden Immunglobulinen der Klasse G und M gegen Phospholipide und Cholesterol (Alving, 1984; Alving und Swartz, 1991) sowie C-reaktivem Protein führt zur Aktivierung der klassischen (Funato *et al.*, 1992; Devine *et al.*, 1994) oder alternativen Komplementkaskade (Szebeni *et al.*, 1994) mit der terminalen Formation des membranangreifenden Komplexes (Silversmith und Nelsetuen, 1986a; Silversmith und Nelsetuen, 1986b). Der Einbau der porenbildenden Komplementproteine C5b und C6 bis C9 destabilisiert die Lipidmembran und die Freisetzung der entzündungsvermittelnden Peptide C3a, C4a und C5a führt zu einer Stimulation inflammatorischer Zellen wie Kupfferzellen, basophiler Granulozyten und Mastzellen (Richards *et al.*, 1986; Laing *et al.*, 1994; Rudolph *et al.*, 1996).

Die anschließende Elimination der opsonisierten Liposomen erfolgt zum einen durch Komplementrezeptoren wie z.B. CR3 auf C5a-aktivierten Makrophagen (Scieszka *et al.*, 1991) und Immunglobulin-spezifische Fc-Rezeptoren auf den Zellen des retikuloendothelialen Systems (Metzger, 1991; Derksen *et al.*, 1987), zum anderen durch LDL- und HDL-Rezeptoren auf Hepatozyten (Bisgaier *et al.*, 1989; Acton *et al.*, 1996). Ein suppressiver Einfluß von sogenannten Dysopsoninen wie alpha1-azidem-Glykoprotein (Van Oss *et al.*, 1974) auf die Elimination negativer Phosphatidylserin (PS)-haltiger Liposomen durch Maskierung der Ladung wird gegenwärtig noch

kontrovers diskutiert (Liu *et al.*, 1995; Johnstone *et al.*, 2001). Phosphatidylserin kommt als natürlicher Bestandteil von Zellmembranen physiologischerweise ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran vor (Op den Kamp, 1979). Wird PS während der Aktivierung von Blutplättchen oder infolge einer Apoptose auch in die äußere Lipidschicht eingebaut, so kann es - via spezifischer PS-Rezeptoren - durch Makrophagen erkannt werden (Schroit *et al.*, 1985; Savil *et al.*, 1993). Vermutlich können derart auch PS-haltige Liposomen aus der Blutzirkulation eliminiert werden (Scherphof und Kamps, 1998). Zudem vermitteln sogenannte Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen und Leberendothelzellen, die spezifisch für polyanionische Moleküle und makromolare Komplexe sind, die Erkennung und Aufnahme insbesondere negativer Liposomen (Krieger und Herz, 1994; Kodama *et al.*, 1996).

Die pharmakokinetischen Parameter von Liposomen beruhen auf ihren physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Ladung, Membranzusammensetzung und Lipidpackungsdichte sowie der applizierten Dosis und den Effekten einer sterischen Stabilisierung (Allen und Stuart, 1999; Oku und Namba, 1994; Ishida, 2002).

Da kleine Liposomen bis 100 nm Größe infolge ihrer hohen Membrankurvatur nur eine kleine Plattform für den Aufbau des Komplement-Komplexes bieten, zeigen sie eine deutlich längere Plasmaverweildauer als 500-1000 nm große Liposomen (Chonn *et al.*, 1992; Harashima *et al.*, 1994).

Die Ladung von Liposomen beeinflusst deren Halbwertszeit in vielfältiger Art und Weise. So aktivieren positiv geladene Liposomen die klassische Komplementkaskade, hingegen aktivieren Phosphatidylethanolamin (PE)- und PS-haltige negative Liposomen die Komplementkaskade über den alternativen Weg, während eine Aktivierung durch neutrale Liposomen mit einem hohen Anteil an Phosphatidylcholin (PC) und Cholesterol unterbleibt (Ishida *et al.*, 2001; Drummond *et al.*, 1999; Szebeni, 1998). Der Einbau

negativ geladene Lipide bedingt jedoch keine Komplementaktivierung *per se*, da insbesondere negativ geladene Lipide wie das Monosialogangliosid GM1 (Gabizon und Papahadjopoulos, 1988) oder Phosphatidylinositol (PI) (Gabizon *et al.*, 1990) sowie Lipidderivate wie Palmitylglucuronid (Namba *et al.*, 1990) die Plasmaverweildauer verlängern können. Bei diesen Lipiden wird die negative Ladung durch die großen hydrophilen Kopfgruppen abgeschirmt (Oku und Namba, 1994; Harasym *et al.*, 1998)¹.

Die Lipidkomposition von Liposomen beeinflusst zum einen deren Ladung, zum anderen ihre Membranfluidität und -permeabilität (New, 1989). Eine rigide Liposomenmembran reduziert die Adsorption und Penetration opsonisierender Serumproteine und verlängert derart die Plasmaverweildauer der Liposomen (Senior und Gregoriadis, 1982; Agarwal *et al.*, 1986). Der Einbau synthetischer Lipide mit langkettigen und ungesättigten Fettsäuren verringert die Fluidität der Lipidmembran gegenüber einer Mischung von Lipiden mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wie sie z.B. bei der Gewinnung von PC aus Ei oder Soja entsteht. So haben z.B. Liposomen aus Distearoyl-PC eine rigidere Lipidmembran und längere Plasmaverweildauer als Liposomen aus Dipalmitoyl- oder Dioleoyl-PC oder Ei-PC (Senior, 1987). Cholesterol erhöht die Rigidität der Membran, indem es sich zwischen die Fettsäureketten einlagert (Gregoriadis und Davis, 1979; Patel *et al.*, 1983; Senior und Gregoriadis, 1982). Liposomen aus Sphingomyelin (SM), Cholesterol (Chol) und PC zeigen eine längere Plasmaverweildauer als Liposomen aus Chol und PC ohne SM, da Sphingomyelin membranstabilisierende intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Cholesterolmolekülen einzugehen vermag (Allen *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1977; Sankaram und Thompson, 1990). Die Fluidität der Lipidmembran beeinflusst nicht nur die Affinität des Liposoms für opsonisierende Plasma- und Serumproteine, sondern auch sein Vermögen, sich nach Anheftung via Scavenger-

¹ Die Elimination negativer Liposomen durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose via PS- und Scavenger-Rezeptoren wurde weiter oben bereits erläutert.

Rezeptoren durch das fenestrierte Endothel der Leber zu zwängen (Extrusionsmechanismus) (Spanjer *et al.*, 1986; Scherphof und Kamps, 2001). So gelangen zwar fluide Liposomen aus PS mit ungesättigten Fettsäuren in den perisinusoidalen Disse-Raum, nicht jedoch Liposomen aus Phosphatidylglycerol (PG) oder PS mit gesättigten Fettsäuren (Daemen *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1999; Scherphof *et al.*, 2000).

Hydrophile Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) oder natürliche Glycolipide wie GM1 umgeben die Liposomen mit einer hydrophilen periliposomalen Hülle (Needham *et al.*, 1992) und reduzieren die Adsorption und Inkorporation opsonisierender Proteine - v.a. des Komplementsystems - in die Lipidmembran (*steric obstruction*) (Papisov *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 1998) sowie die Interaktion mit Rezeptoren auf den Zellen des retikuloendothelialen Systems, die letztlich eine Aufnahme und Elimination der Liposomen vermitteln (*steric shielding*) (Papisov *et al.*, 1996; Gabizon und Papahadjopoulos, 1992; Mori *et al.*, 1991). Eine solche sterische Stabilisierung vermag zudem die immunogenen Fc-Teile inkorporierter Antikörper zur Zielsteuerung der Liposomen abzuschirmen, wenn diese nicht zwecks besserer Erreichbarkeit an die Enden der Polymere angeheftet sind (vgl. Abb. 1.1. aus der allgemeinen Einleitung) (Maruyama *et al.*, 1999).

Die Plasmaverweildauer konventioneller Liposomen kann zudem durch hohe applizierte Lipiddosen verlängert werden, da opsonisierende Proteine aus dem Blut depletiert werden (Harashima *et al.*, 1993; Oja *et al.*, 1996) und phagozytierende Zellen des retikuloendothelialen Systems in ihrer Aufnahmekapazität eingeschränkt sind (Abra und Hunt, 1981; Hwang, 1987).

Insbesondere die Entdeckung der sterischen Stabilisierung mittels hydrophiler Polymere wie PEG durch Klibanov *et al.* 1990 wurde lange Zeit als ein Meilenstein in der Entwicklung wirksamer Liposomen für eine systemische *in vivo* Anwendung von Liposomen angesehen (Storm und

Crommelin, 1998). Pegylierte Liposomen induzieren jedoch bei wiederholten Anwendungen bislang unbekannte Plasmaproteine mit der Folge einer deutlich verkürzten Plasmaverweildauer (Dams *et al.*, 2000; Laverman *et al.*, 2001). Zudem vermögen weder GM1 noch PEG, bestimmte Membranlipideigenschaften abzuschirmen, wie z.B. die Verkürzung der Plasmaverweildauer von Liposomen durch PS (Allen *et al.*, 1988).

Diese und weitere Nachteile sterisch stabilisierter Liposomen gegenüber konventionellen Liposomen, wie z.B. ein geringeres Einschlussvermögen für Inhaltsstoffe sowie deren verminderte Freisetzung am erkrankten Gewebe veranlassten bereits 1999 Drummond *et al.* zu der Frage, ob konventionelle Liposomen überhaupt hinreichend optimiert wurden. Vor diesem Hintergrund besteht der Ausgangspunkt einer solchen Optimierung konventioneller Liposomen - insbesondere im Hinblick auf die genannten Mechanismen ihrer Elimination aus der Blutzirkulation - darin, ihre physikochemischen Eigenschaften wie Ladung und Lipidzusammensetzung zu variieren, um das Ziel einer verlängerten Plasmaverweildauer zu erreichen.

2.2. ERGEBNISSE

Biophysikalische, zellbiologische und physiologische in vitro und in vivo Charakterisierung

2.2.1. ÜBERBLICK

Vorgehensweise bei der Optimierung zweier Ausgangsformulierungen

Sterisch stabilisierte Liposomen weisen hinsichtlich ihres Potentials, Inhaltsstoffe effizient zu verpacken und diese am erkrankten Gewebe wieder freizusetzen, deutliche Nachteile gegenüber konventionellen Liposomen auf. Diese ihrerseits können Inhaltsstoffe zwar sehr effizient verpacken und freigeben, jedoch ist infolge ihrer in der Regel sehr kurzen Plasmaverweildauer der Transport zum Tumor sehr ineffizient.

Daher sollten hier unterschiedliche Strategien untersucht werden, um konventionelle Liposomen auf der Grundlage zweier beschriebener und patentierter Formulierungen insbesondere hinsichtlich ihrer Plasmaverweildauer zu optimieren (siehe hierzu Abbildung 2.1.). Bei den Ausgangsformulierungen handelte es sich um AVE3¹ (Müller *et al.*, 2001; Patent Müller *et al.*, 2000) und AVE6² (Chander und Schreier, 1992; Patent Schreier *et al.*, 1992).

In einem ersten Schritt wurde der Einfluß einer sukzessiven PEGylierung der AVE3 untersucht, insbesondere um zu analysieren, wie groß speziell für diese Liposomenformulierung die Spanne der Plasmaverweilzeiten von konventionellen und sterisch stabilisierten Liposomen ist. Es folgte der Austausch von PS gegen PG (AVE5³) sowie gegen PC (AVE14⁴).

¹ Zusammensetzung AVE3: 33,3% Chol; 33,3% PS; 33,3% PE (s. hierzu Tab. 8.1.), Abkürzungen siehe Anhang 8.2.

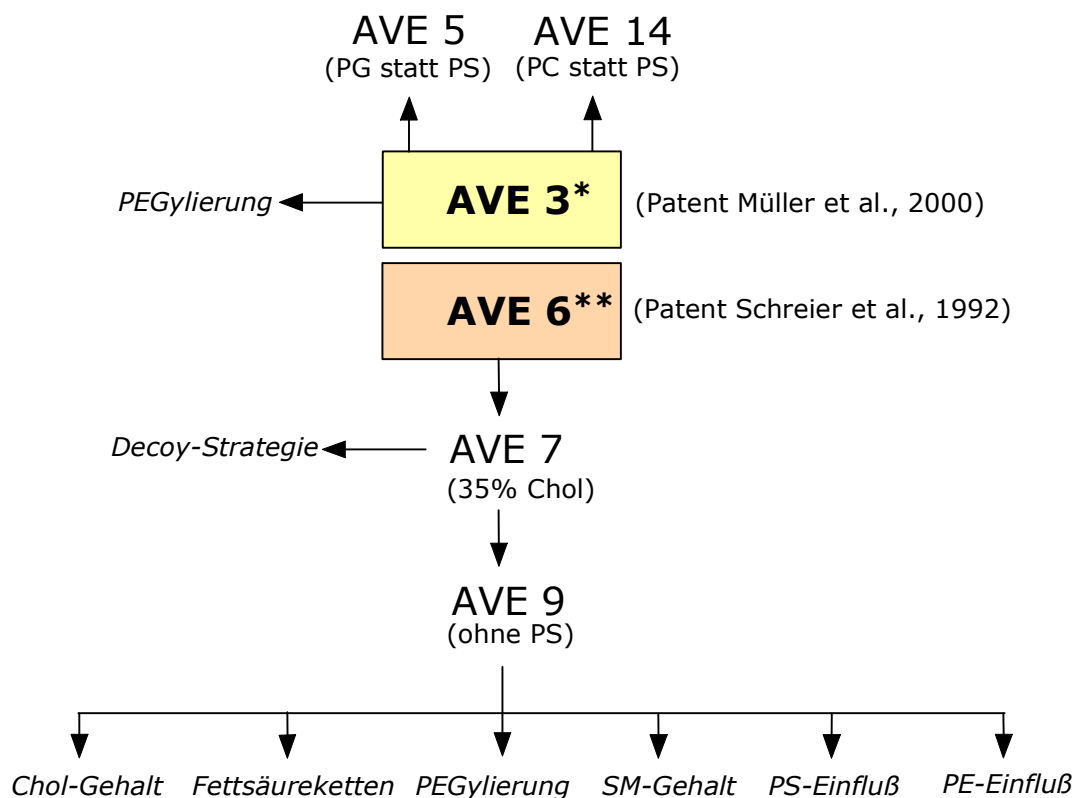
² Zusammensetzung AVE6: 48% Chol; 13% PS; 12% PE; 22% PC; 15% SM (s. hierzu Tab. 8.1.). Diese Liposomen entsprechen einer AVE-Formulierung gleicher Zusammensetzung, die jedoch nach der Doppel-Dialyse-Methode (s. hierzu Schreier *et al.*, 1993) statt nach der Film-Hydratisierungs-Methode hergestellt wurden.

³ Zusammensetzung AVE5: 33,3% Chol; 33,3% PG; 33,3% PE (s. hierzu Tab. 8.1.)

⁴ Zusammensetzung AVE14: 33,3% Chol; 33,3% EPC; 33,3% PE (s. hierzu Tab. 8.1.)

Ausgehend von den AVE6 erfolgte zunächst in Anlehnung an die AVE3 eine Reduzierung des Chol-Gehalts von 50% auf 35% (AVE7⁵). Mit diesen Liposomen wurde insbesondere eine sog. Decoy-Strategie zur Absättigung des retikuloendothelialen Systems zur Verlängerung der Plasmaverweildauer durch Präinjektion der Liposomen untersucht. Die Elimination des PS aus den AVE7 führte in einem weiteren Schritt zu AVE9⁶, die sich durch eine besonders lange Plasmaverweildauer sowie eine Akkumulation im Tumor auszeichneten.

Die Möglichkeit, diese Liposomen durch Variation des Chol-Gehalts, der Fettsäureketten der verwendeten Lipide oder des SM-Gehalts weiter zu optimieren, wurde im weiteren ebenso untersucht wie der Einfluß des PE oder einer PEGylierung.



* Zusammensetzung AVE3: 33,3% Chol; 33,3% PS; 33,3% PE

** Zusammensetzung AVE6: 48% Chol; 13% PS; 12% PE; 12% PC; 15% SM

Abb. 2.1. Übersicht über die Strategie der Versuchsplanung

⁵ Zusammensetzung AVE7: 35% Chol; 15% PC; 15% PE; 17% PS; 18% SM (s. hierzu Tab. 8.1.)

⁶ Zusammensetzung AVE9: 35% Chol; 32% PC; 15% PE; 18% SM (s. hierzu Tab. 8.1.)

2.2.2. BIOPHYSIKALISCHE IN VITRO CHARAKTERISIERUNG

Größe, Zetapotential, Phasenübergangstemperatur, kryoelektronenmikroskopische Bilder und Lagerstabilität der untersuchten Liposomenformulierungen

2.2.2.1. GRÖßEN

Für die Untersuchung der Größen der Liposomen wurden diese einen Tag nach der Herstellung mittels PCS (Photonenkorrelations-Spektroskopie) vermessen (s. Abschnitt 6.7.4.7.). Für jede Formulierung wurden jeweils mindestens 3 Präparationen miteinander verglichen.

Unter Standard-Herstellungsbedingungen⁷ entstanden bei sämtlichen Formulierungen Vesikel, deren hydrodynamische Durchmesser 60 bis 120 nm betrugen (siehe hierzu Abbildung 2.2.). Zudem ließen sich alle Formulierungen hinsichtlich ihrer Größe reproduzierbar herstellen, wobei die größte Standardabweichung (12,84 nm) bei AVE14 zu verzeichnen war.

Die Größen der AVE3, AVE5 und AVE14 Formulierungen lagen zwischen 82 und 88 nm und zeigten keine deutlichen Unterschiede.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den AVE6, AVE7, AVE9 und AVE11⁸ (letzere entsprechen der AVE9-Formulierung, besitzen jedoch einen geringen Anteil an Phosphatidylserin), deren Mittelwerte ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen und im Bereich von 85 bis 101 nm gemessen wurden.

Innerhalb der verschiedenen Formulierungen der AVE9 zeigten sich jedoch deutliche Größenunterschiede. So nimmt die Größe bei steigendem Cholesterolgehalt zu (AVE9'⁹ 70,1 nm bis AVE9'''''' 102,65 nm). Hingegen bewirkten Veränderungen der eingesetzten Menge SM, der Einsatz

⁷ Standard-Herstellungsbedingungen: Lipidkonzentration 10 µmol pro ml; Ansatzgröße 2 ml; Membranfilterporendurchmesser 50 nm; Herstellung mittels LiposoFast®-Extruder; Hydratationsmedium Tris 10mM pH7,4 (s. auch Abschnitt 6.7.4.4.)

⁸ Zusammensetzung AVE11: 35% Chol; 29% PC; 15% PE; 3% PS; 18% SM (s. hierzu Tab. 8.1.)

⁹ AVE9', AVE9'', usw. bis AVE9'''''' entsprechen AVE9-Formulierungen mit 10%, 20%, usw. bis 50% Cholesterol (s. hierzu Tab. 8.2.)

gesättigter Phospholipide und der zusätzliche Einbau von PEG keine wesentlichen Größenveränderungen der Partikel.

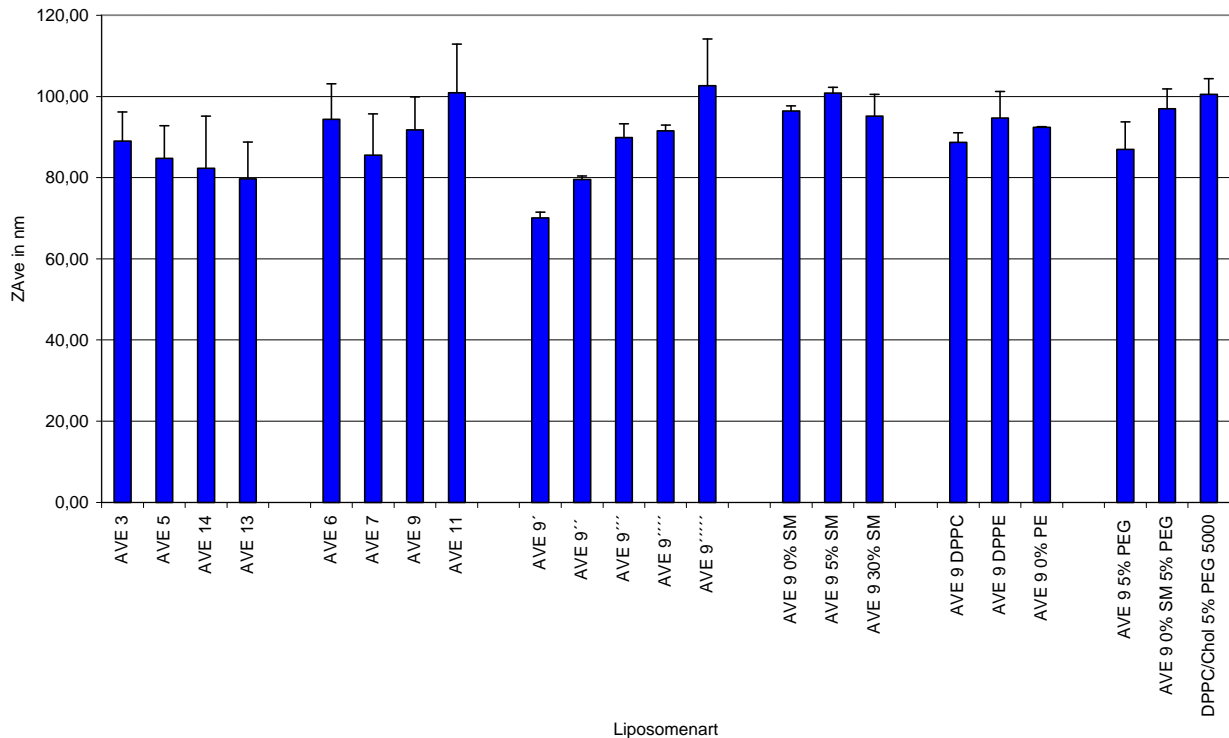


Abb. 2.2. Hydrodynamischer Liposomendurchmesser (gemessen mittels PCS)

Die Polydispersitätsindizes waren bei allen untersuchten Formulierungen stets kleiner als 0,15. Die Zusammensetzung der Liposomenformulierungen sind den Tabellen 8.1. bis 8.4. zu entnehmen.

2.2.2.2. ZETAPOTENTIALE

Zur Untersuchung der Oberflächenladungen der untersuchten Formulierungen wurden die Zetapotentiale 24 Stunden nach der Herstellung der Liposomen unter Standardbedingungen im gleichen Puffer vermessen (s. Abschnitt 6.7.4.8.). Es wurden jeweils mindestens 3 Chargen zur Bestimmung des Zetapotentialmittelwertes herangezogen.

AVE3 zeigten mit -67 mV das negativste Zetapotential (siehe hierzu Abbildung 2.3.). Die ebenfalls PS-haltigen Formulierungen AVE6 und AVE7 wiesen hingegen ein Zetapotential von -58,05 bzw. -49,27 mV auf. AVE5, als negativ geladene Vergleichsformulierung zu AVE3, hatte mit -43,35 mV eine deutlich reduzierte Oberflächenladung.

Die Zetapotentialbestimmung der Präparationen AVE14 und AVE13¹⁰, die keine negativ geladenen Lipide in ihrer Membran im Gegensatz zu AVE3 und AVE5 tragen, resultierte in Werten von -11,84 und -19,50 mV. Auch die ebenfalls ladungsneutralen AVE9 hatten mit -7,94 mV ein sehr geringes Zetapotential. Die Veränderung des Cholesterolgehaltes der AVE9-Formulierung führte zu Oberflächenladungen die alle zwischen -6 und -3 mV lagen und sich daher nur wenig von den AVE9 unterschieden.

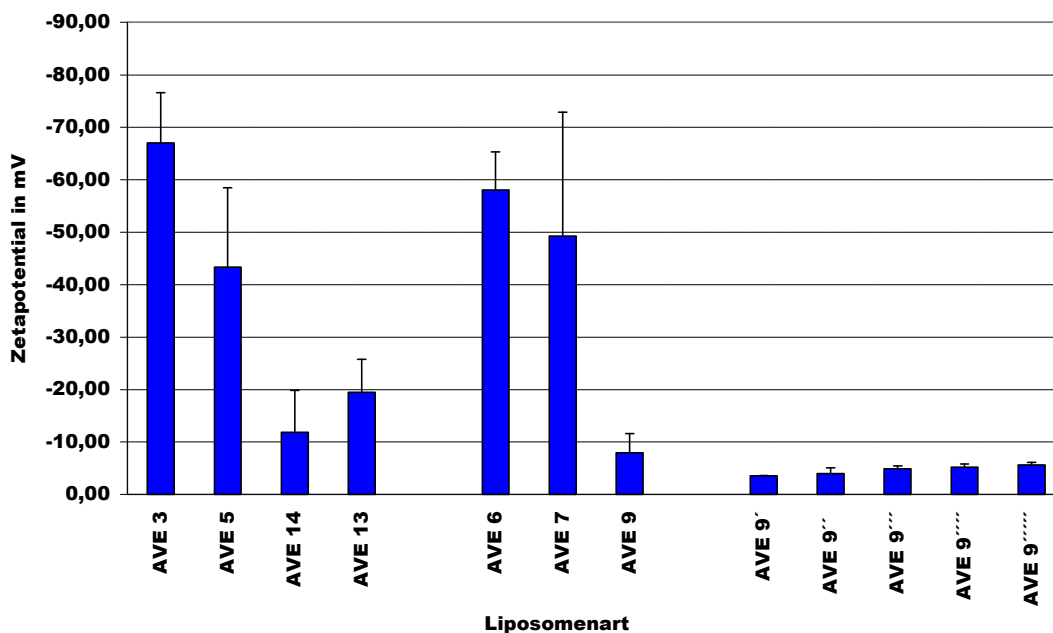


Abb. 2.3. Zetapotentiale der untersuchten Liposomenpräparationen

¹⁰ Hierbei handelt es sich um eine Formulierung auf AVE3-Basis, deren PS-Anteil durch DPPC ersetzt ist. Zusammensetzung AVE13: 33,3% Chol; 33,3% DPPC; 33,3% PE. Der Unterschied zu den AVE14 liegt in der Verwendung von DPPC statt EPC (s. hierzu Tab. 8.1.).

2.2.2.3. KRYOELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Um neben der Größe der Vesikel eine Aussage über Form, Größenverteilung und Lamellarität zu machen, wurden von einigen Chargen von Herrn Steiniger am Zentrum für Elektronenmikroskopie in Jena kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe hierzu Abbildung 2.5.).

Im mikroskopischen Präparat erschienen AVE3 als meist bilamellare Liposomen mit einer einheitlichen Größenverteilung im Bereich zwischen 80 und 150 nm. Die Form der Vesikel war zumeist kreisrund. Hingegen waren AVE5 größtenteils unilamellar und ihre Form variierend von kreisrund bis oval länglich. Die Größenstreuung von 50 bis 230 nm ist wesentlich breiter als bei AVE3. AVE14 sind ähnlich gestreut und geformt wie AVE3, besitzen aber hauptsächlich einen unilamellaren Aufbau.

Die Form der AVE9 Vesikel ist meistens leicht oval. Die 50 bis 120 nm großen Partikel sind größtenteils unilamellar aufgebaut.

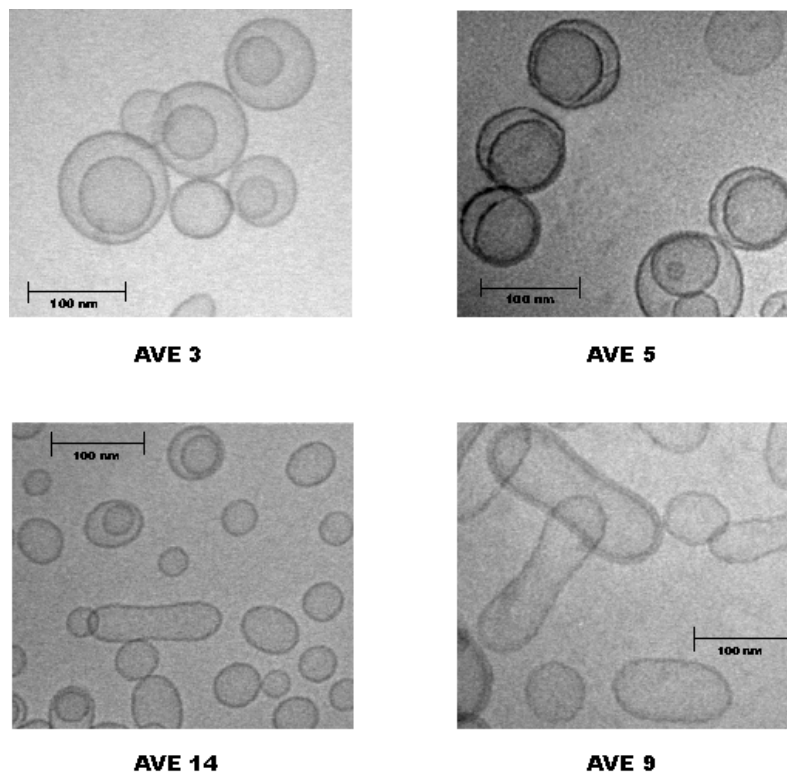


Abb. 2.4. Kryoelektronenmikroskopische Bilder der untersuchten Liposomenpräparationen

2.2.2.4. LAGERSTABILITÄTEN

Zur Untersuchung der Stabilität der Liposomenformulierungen während einer längeren Lagerung wurden diese nach ihrer Herstellung und Sterilfiltration im Kühlschrank bei 4°C bis 8°C gelagert. Zur Überprüfung der Stabilität wurden in etwa wöchentlichem Abstand Proben der Chargen entnommen und mittels PCS hinsichtlich der Partikelgröße analysiert.

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes zeigten die AVE3, AVE6, AVE7 und AVE9 keine oder nur eine sehr geringe Wachstumstendenz (siehe Abbildung 2.5.). So zeigten die AVE3 und die AVE7 lediglich ein Wachstum um ca. 2 nm. AVE6 und AVE9 hingegen wuchsen in dieser Zeit um etwa 10 nm.

Im Gegensatz zu diesen recht stabilen Formulierungen zeigten die AVE13, eine auf den AVE3 basierende Formulierung, deren PS-Anteil durch DPPC ersetzt ist, eine steile Partikel-Wachstumskurve. Nach 24 Tagen (nicht mehr in der Abbildung dargestellt) wurde eine Größe von über 5000 nm registriert. Da der Messbereich der PCS auf Partikel bis maximal 5000 nm beschränkt ist, wurde die Messreihe hier abgebrochen. Die Vesikel dieser Charge hatten bereits nach 9 Tagen etwa eine Größenverdopplung (170,3 statt 70,7 nm) erfahren und waren somit wesentlich instabiler als z.B. AVE3.

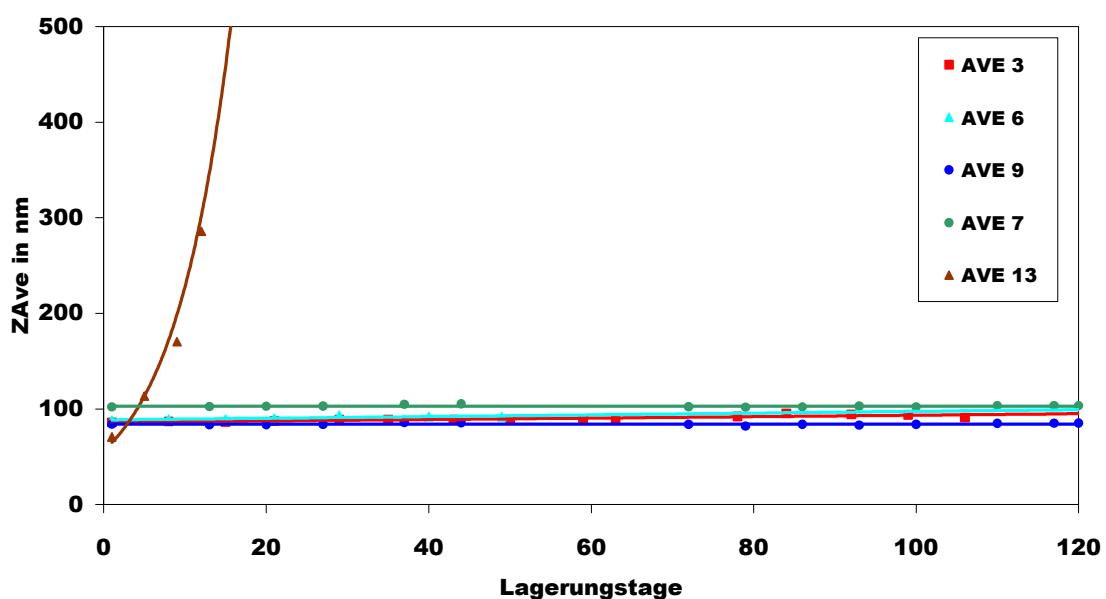


Abb. 2.5. Lagerstabilität der untersuchten Liposomenpräparationen

2.2.3. ZELLBIOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE IN VITRO CHARAKTERISIERUNG

Bindungsstudien, Komplement- und Plasmaproteininteraktion

2.2.3.1. BINDUNGSSTUDIEN

Um die Bindungseigenschaften verschiedener Liposomenformulierungen für Tumorgewebe zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit Rhodamin-markierten Liposomen unternommen (s. Abschnitt 6.7.2.6.).

Hierzu wurden im FACS insbesondere AVE3 mit AVE14 - eine Formulierung auf AVE3-Basis, die durch den Austausch von PS gegen PC entstanden ist - sowie AVE3, die etwa 33% PS enthalten, mit AVE9, die kein PS enthalten und AVE7 mit AVE9 - eine Formulierung auf AVE7-Basis, die durch den Austausch von PS gegen PC entstanden ist - verglichen (die genauen Liposomenzusammensetzungen sind der Tabelle 8.1. zu entnehmen).

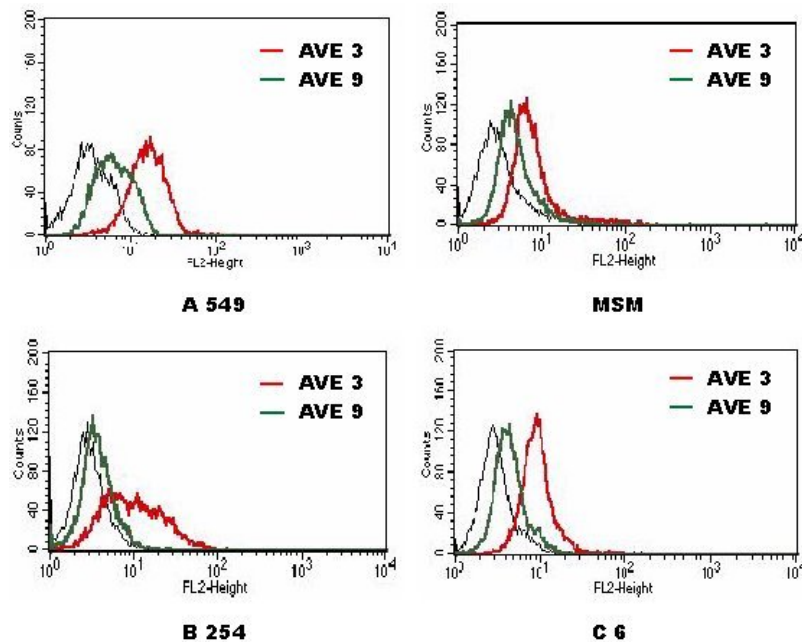


Abb. 2.6. FACS-Bindungsstudien verschiedener Liposomen an verschiedenen Tumorzelllinien

Zelllinien: A549: humanes Lungenkarzinom; MSM, B254: humane Melanome; C6: Rattenglioblastom. Die grauen Kurven in der Abbildung entsprechen den unbehandelten Kontrollzellen.

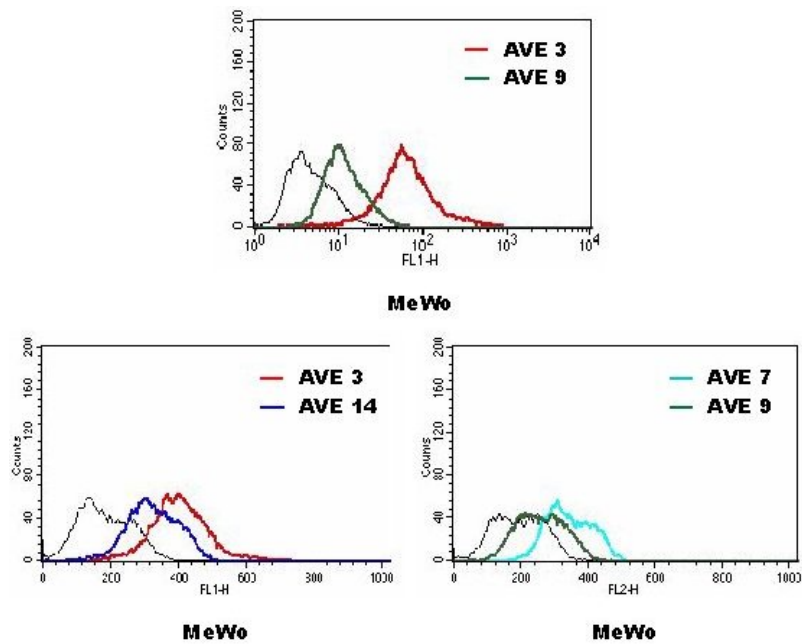


Abb. 2.7. FACS-Bindungsstudien verschiedener Liposomen an Tumorzelllinien
Zelllinie: MeWo: humanes Melanom. Die grauen Kurven in der Abbildung entsprechen den unbehandelten Kontrollzellen.

Die Abbildungen 2.6. und 2.7. zeigen, dass AVE3 deutlich stärker an alle untersuchten Tumorzelllinien gebunden haben als AVE9. Auch haben AVE3 stärker an MeWo-Zellen gebunden als AVE14. Ferner stellte sich heraus, dass AVE7 eine höhere Affinität für MeWo-Zellen besaßen als AVE9. Die Substitution von PS durch PC verringerte in diesem Experiment also die Bindung, bzw. Aufnahme der Liposomen durch die Tumorzellen.

2.2.3.2. INTERAKTION MIT KOMPLEMENTFAKTOREN

Die Interaktion von AVE3 und AVE9 mit humanen Komplementfaktoren wurde mit Hilfe eines gesamthämolytischen Komplementassays untersucht (s. Abschnitt 6.7.1.17.). Hierzu wurden 0,5 nmol bis 16 nmol Liposomen mit humanem Serum inkubiert. Binden die Komplementfaktoren vollständig an

die Liposomen, so kommt es zu keiner kreisförmigen Lyse um die Probe herum.

Die Abbildung 2.8. zeigt, dass AVE3 bei einer Konzentration von 16 nmol bis 2 nmol die Komplementfaktoren vollständig gebunden haben. Erst ab einer geringen Konzentration von 1 nmol kam es zu einer Lyse, da nicht mehr alle Komplementfaktoren abgefangen wurden. AVE9 hingegen haben in keiner der untersuchten Konzentrationen sämtliche Komplementfaktoren gebunden, da es bei allen Konzentrationen zu einer deutlichen Lyse kam.

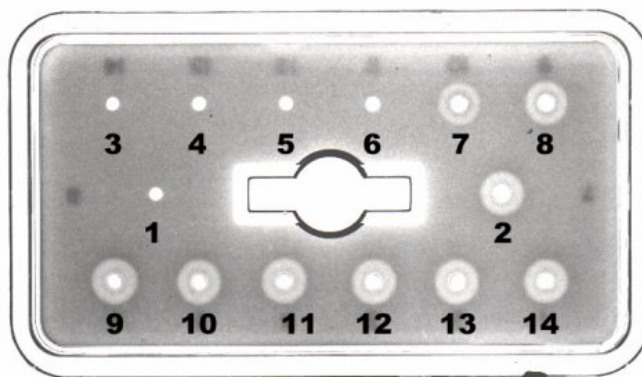


Abb. 2.8. Bindung von Komplementfaktoren an AVE3 und AVE9

Die Abbildung zeigt eine gesamthämolytische Komplementplatte. Als Negativkontrolle (Probe 1) wurde hitzeinaktiviertes humanes Serum und als Positivkontrolle (Probe 2) humanes Serum aufgetragen. Die Proben 3-8 zeigen AVE3 in verschiedenen Konzentrationen, die mit humanem Serum inkubiert worden waren (Probe 3: 16 nmol; Probe 4: 8 nmol; Probe 5: 4 nmol; Probe 6: 2 nmol; Probe 7: 1 nmol; Probe 8: 0,5 nmol Lipid). Die Proben 9-14 zeigen AVE9 in verschiedenen Konzentrationen, die mit humanem Serum inkubiert worden waren (Probe 9: 16 nmol; Probe 10: 8 nmol; Probe 11: 4 nmol; Probe 12: 2 nmol; Probe 13: 1 nmol; Probe 14: 0,5 nmol Lipid).

2.2.3.3. INTERAKTION MIT PLASMAPROTEINEN

Um die Interaktion der Liposomen mit Plasmaproteinen zu untersuchen, wurden die untersuchten Liposomen zunächst mit humanem Plasma für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Sepharose 4B Säule mittels Größenausschlußchromatographie von den freien, nicht gebundenen Plasmaproteinen, abgetrennt (s. Abschnitt 6.7.4.1. und 6.7.4.2.). Um zu ermitteln, in welchen Fraktionen sich Liposomen, bzw. freie Plasmaproteine

wiederfinden, wurden in vorhergehenden Versuchen sowohl C14-Cholesteryloleat-markierte AVE3 und AVE9 sowie AVE3 und AVE9, die zuvor mit humanem Plasma inkubiert worden waren, als auch freies humanes Plasma selbst säulenchromatographisch aufgetrennt.

Wie der Abbildung 2.9. zu entnehmen ist, ließen sich die Liposomen in den Fraktionen 4-6 wiederfinden.

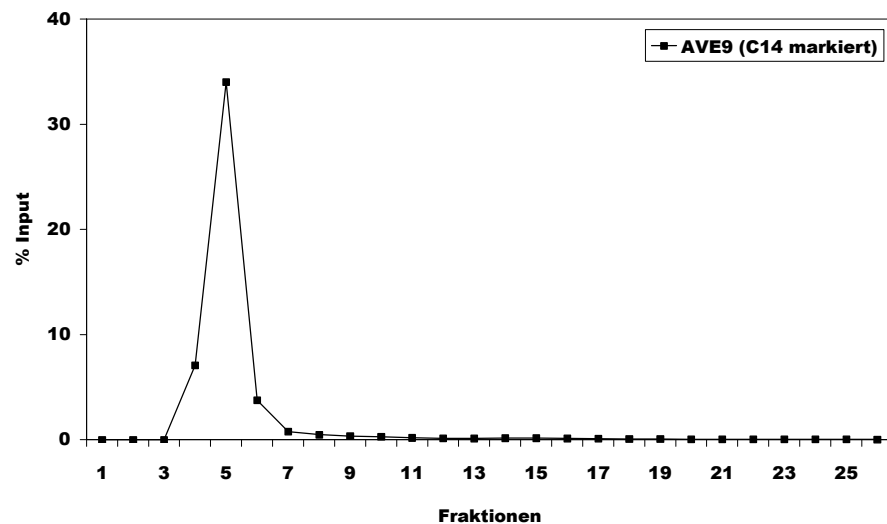


Abb. 2.9. Säulenchromatographische Auftrennung von Liposomen

Die Abbildung zeigt exemplarisch die chromatographische Auftrennung C14-Cholesteryloleat-markierter AVE9 über eine Sepharose 4B Säule. Gesammelt wurden Fraktionen von jeweils 560 µl.

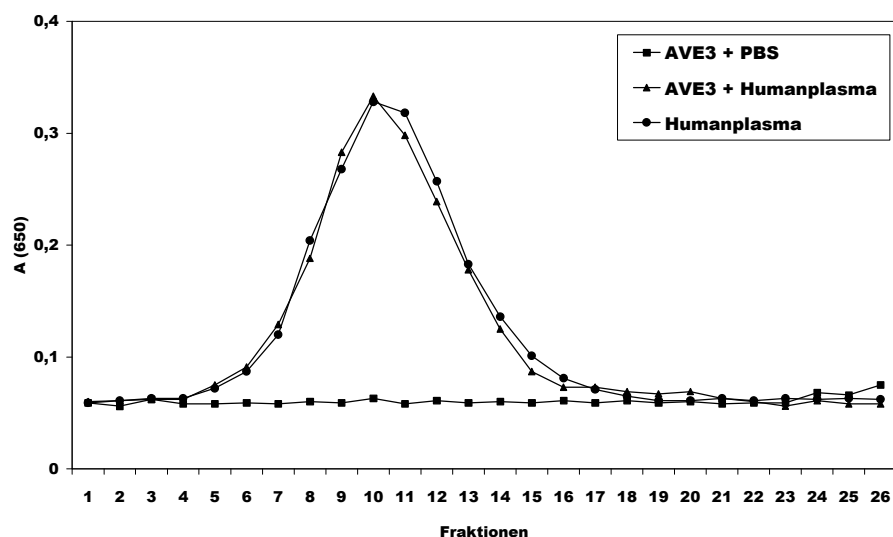


Abb. 2.10. Proteinnachweis von aufgetrenntem humanem Plasma

Freies humanes Plasma, AVE3 oder zuvor mit humanem Plasma inkubierte AVE3 wurden jeweils säulenchromatographisch über eine Sepharose 4B Säule aufgetrennt. Gesammelt wurden Fraktionen von jeweils 560 µl. Der Proteinnachweis in den einzelnen Fraktionen erfolgte mittels eines Biorad Dc Assays.

Aus der Abbildung 2.10. (s. vorherige Seite) ist ersichtlich, dass sich die Proteine über einen breiten Bereich in den Fraktionen 5-15 wiederfanden. Die höchste Proteinkonzentration hatten die Fraktionen 9-12. Die Abbildung verdeutlicht ferner, dass Liposomen die Messung nicht beeinflussten.

Die Abbildung 2.11. (s. nächste Seite) zeigt die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen 4-6 und 11 von freiem Humanplasma sowie von AVE3 und AVE9, die mit Humanplasma inkubiert worden waren (s. Abschnitt 6.7.1.15. und 6.7.1.16. sowie 6.7.4.3.). Deutlich erkennbar erscheinen die ersten Proteinbanden für Humanplasma und AVE9 ab der Fraktion 5, für AVE3 erscheinen sie bereits in Fraktion 4, ein deutliches Indiz für ihre Bindung an AVE3. Die mit den Pfeilen indizierten Banden konnten massenspektroskopisch durch Herrn Dr. Jürgen Adamkiewics am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg als Apolipoprotein A IV und Apolipoprotein A I identifiziert werden.

In Abbildung 2.12. (s. nächste Seite) wurden die Fraktionen 4 und 11 von AVE3, AVE5, AVE9 und AVE14 untersucht. Die gleich starken Banden in den Fraktionen 11 zeigen, dass die Liposomen mit gleichen Plasmamengen inkubiert wurden. Sowohl AVE3 als auch AVE5 zeigten viele Proteinbanden in der Fraktion 4. Für AVE9 und AVE14 fanden sich keinerlei Proteinbanden, ein deutliches Indiz dafür, dass keine nachweisbaren Mengen an Plasmaproteinen an die Liposomen gebunden hatten.

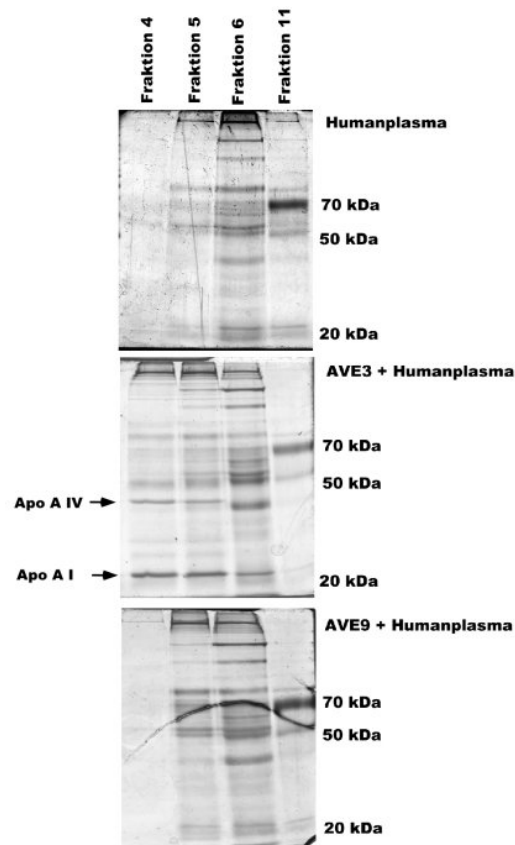


Abb. 2.11. SDS-gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener Fraktionen von säulenchromatographisch aufgetrenntem humanen Plasma, sowie AVE3 und AVE9

(Apo A IV: Apolipoprotein A IV; Apo A I: Apolipoprotein A I)

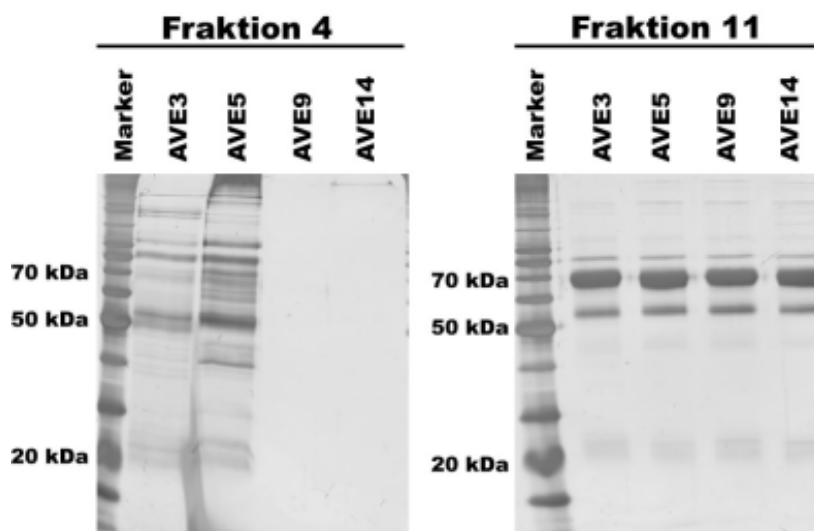


Abb. 2.12. SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen 4 und 11 säulenchromatographisch aufgetrennter AVE3, AVE5, AVE9 und AVE14

2.2.4. PHYSIOLOGISCHE *IN VIVO* CHARAKTERISIERUNG

Plasmaverweilzeiten, Organverteilungen und Tumorakkumulation

2.2.4.1. KINETIKEN UND ORGANVERTEILUNGEN

Nach der biophysikalischen Charakterisierung der verschiedenen Liposomenformulierungen und den ersten Hinweisen aus der zellbiologischen und physiologischen *in vitro* Charakterisierung auf mögliche Einflussfaktoren der Plasmaverweildauer - wie z.B. die Bindung an Komplementfaktoren oder Plasmaproteine - sollten im nächsten Schritt die jeweiligen Formulierungen hinsichtlich ihrer Plasmaverweilzeiten sowie ihrer Organverteilungen untersucht werden. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die oben (siehe hierzu Abschnitt 2.2.1.) beschriebene Optimierung der Liposomen für eine beabsichtigte spätere *in vivo* Anwendung für eine Antitumorthérapie gelegt (siehe hierzu später Abschnitt 3.).

Dazu wurden Nacktmäusen MeWo- oder Colon26-Zellen intradermal appliziert und nach Etablierung der Tumore 1000 nmol Lipid entsprechend 10 μ Ci Tritium-markiertem Oleoylether intravenös appliziert. Nach festgelegten Zeitpunkten wurden Blutproben retroorbital entnommen und die Organe nach Töten der Mäuse präpariert (s. Abschnitt 6.7.3.2.).

2.2.4.1.1. AVE3, AVE5 UND AVE14

In einem ersten Schritt sollte ausgehend von AVE3, die zu gleichen Teilen aus PS, PE und Chol bestehen, insbesondere der Einfluß der negativen Ladung des PS sowie des PS per se untersucht werden. Hierzu wurde daher zum einen PS gegen PG unter Beibehaltung eines negativ geladenen Lipids in den Liposomen ausgetauscht (AVE5). Um AVE14 zu erhalten, wurde zum anderen das negativ geladene PS gegen das neutrale PC ausgetauscht.

Abbildung 2.13. zeigt, dass AVE5 gegenüber AVE3 keine deutliche Veränderung in ihrer Elimination aus dem Blut aufwies, während AVE14 gegenüber beiden Formulierungen eine deutlich verringerte Blutelimination mit einer verlängerten Plasmaverweildauer aufwies.

Die Tabelle 2.1. verdeutlicht diesen Sachverhalt insbesondere vor dem Hintergrund der Flächen unter den Kurven (*area under the curve, AUC*), da AVE5 gegenüber AVE3 eine nur etwa doppelt so große Fläche unter der Kurve besaßen, während bei AVE 14 die Fläche etwa 10-fach größer als bei AVE3 war - ein deutliches Indiz für die langsamere Elimination aus dem Blut. Während sich AVE14 nach 20 min. noch zu 65 % im Blut nachweisen ließen, ließen sich von AVE5 nur noch 16 % und von AVE3 sogar nur noch 5 % nachweisen. Auch nach 6 h waren die AVE14 noch mit fast 16 % deutlich im Blut nachweisbar, AVE 3 und AVE5 hingegen lagen zu diesem Zeitpunkt bereits im Bereich der unteren Nachweisgrenze.

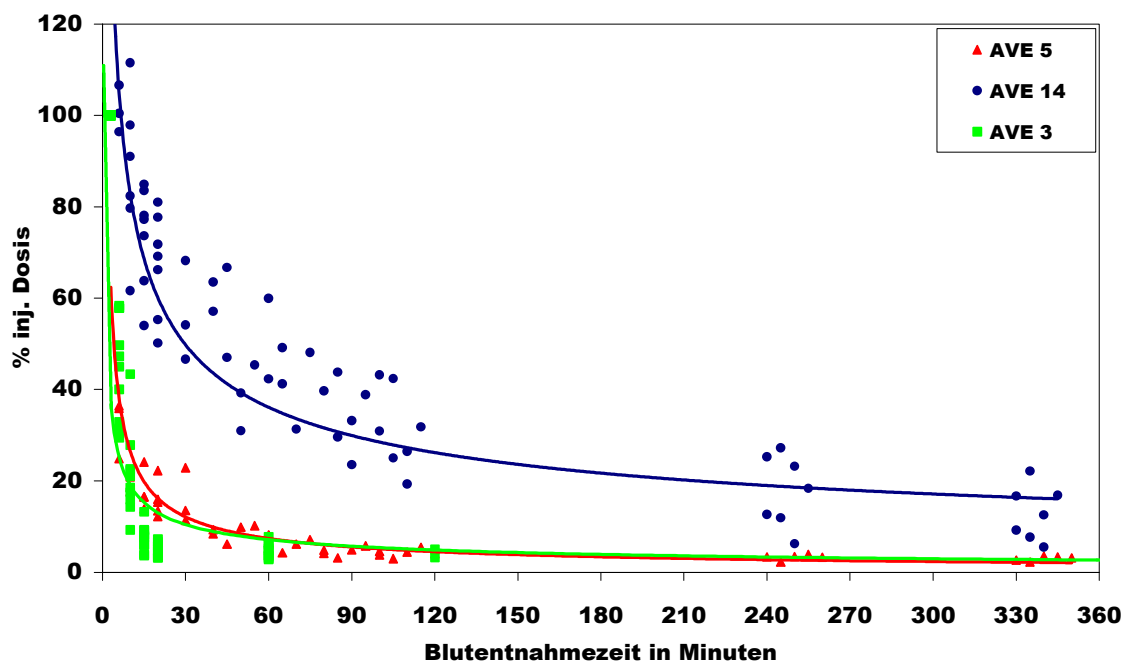


Abb. 2.13. Elimination von AVE3, AVE5 und AVE14 aus dem Blut

Die Werte nach 3 min. wurden hierzu auf 100% normiert, um alle folgenden Werte hierzu in Relation setzen zu können. Die Kurven wurden durch einen logarithmischen Algorithmus aus den Punktwolken errechnet. Injiziert wurden je Maus 1000 nmol Lipid entsprechend 10 μ Ci Tritium-markiertem Cholesteryl-oleylether. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die Abbildungen 2.16./ 2.18./ 2.21./ 2.24./ 2.27./ 2.30. .

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen.

Liposomen	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE3 (n=19)	1015 +/- 366	5,3 +/- 3,4	5,1 +/- 2,4	4,3 +/- 1,9	3,3 +/- 1,7
AVE5 (n=5)	2042 +/- 446	15,9 +/- 3,9	7,6 +/- 2,7	4,2 +/- 0,9	3,0 +/- 0,6
AVE14 (n=7)	10245 +/- 2448	65,2 +/- 11,6	46,6 +/- 15,0	32,3 +/- 10,6	15,9 +/- 11,0

Tab. 2.1. Pharmakokinetische Parameter von AVE3, AVE5 und AVE14

Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC in %min.) wurde für die Werte von 3 min. bis 360 min. berechnet. Die Werte p_t zeigen die zu einer bestimmten Zeit t (in min.) noch prozentual nachweisbare Menge an radioaktivem Cholesteryloleylether. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die Tabellen 2.2. bis 2.7. .

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen.

Der Abbildung 2.14. ist die Organverteilung der Liposomen zu entnehmen. AVE3 zeigten nach 6 h und 24 h eine starke Akkumulation in der Leber (etwa 80%) und eine Akkumulation von etwa 5 % in der Milz. In allen übrigen Organen lag die Aufnahme in den Organen bei unter 0,2 %. Sowohl AVE5 als auch AVE14 hatten demgegenüber nach 6 h eine deutlich geringere Leberakkumulation von etwa 40 %. Für AVE5 war die Milzakkumulation mit etwa 15 % gegenüber den AVE3 um das Dreifache erhöht, für die AVE14 lag sie unverändert bei etwa 5 %. Für beide Formulierungen war die Akkumulation in den übrigen Organen geringer als 0,5 %.

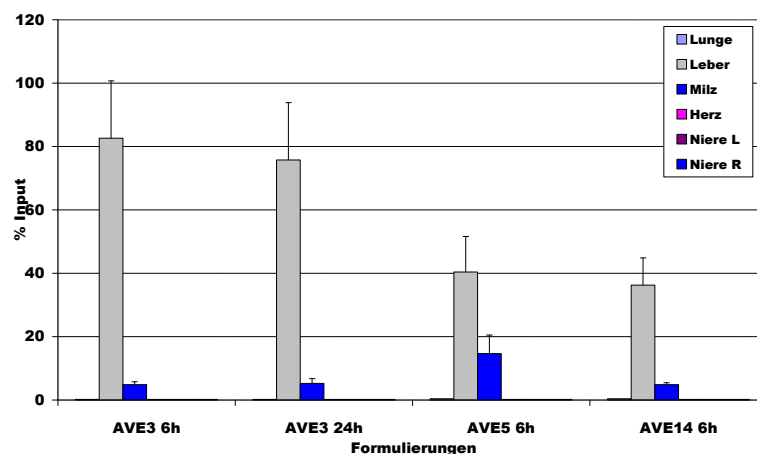


Abb. 2.14. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE3, AVE5 und AVE14

Injiziert wurden je Maus 1000 nmol Lipid entsprechend 10 μ Ci Tritium-markiertem Cholesteryloleylether. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die Abbildungen 2.17./ 2.19./ 2.22./ 2.25./ 2.28./ 2.31. .

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen.

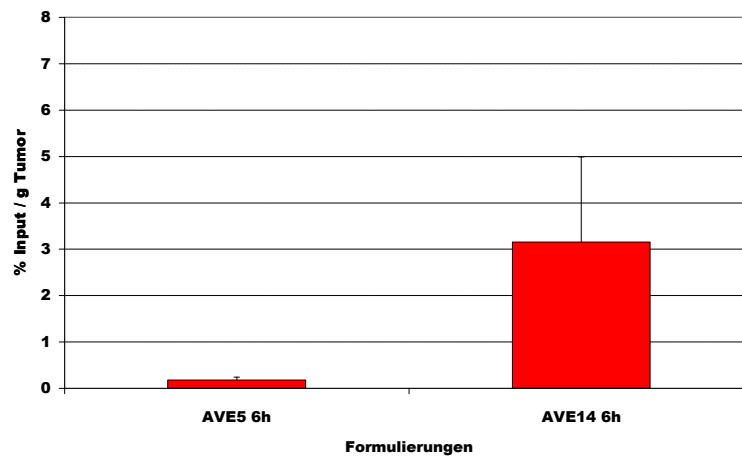


Abb. 2.15. Tumorakkumulation nach 6 Stunden von AVE3, AVE5 und AVE14

Injiziert wurden je Maus 1000 nmol Lipid entsprechend 10 μ Ci Tritium-markiertem Cholesteryloleylether. Zu beachten ist der Bezug auf das Tumorgewicht um Schwankungen der Tumorgroße in den unabhängigen Versuchen zu nivellieren. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die Abbildungen 2.20./ 2.23./ 2.26./ 2.29./ 2.32. . Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen.

In der Abbildung 2.15. wird die Akkumulation von AVE5 und AVE14 im Tumor nach 6 h, bezogen auf das Gewicht des Tumors, miteinander verglichen. Hier ist der Bezug auf das Gewicht des Tumors von besonderer Bedeutung, da im Gegensatz zu den übrigen Organen, die in der Regel in verschiedenen Mäusen ein sehr ähnliches Gewicht besitzen, dies für Tumore nicht der Fall sein muss und die Gewichte der Tumore von Versuch zu Versuch größeren Schwankungen unterliegen können.

AVE14 zeigten eine etwa 15 mal stärkere Akkumulation im Tumor als die AVE5 (3 % für AVE14 gegenüber 0,2 % für AVE5).

2.2.4.1.2. AVE3 UND AVE3 2,5 % / 5 % / 7,5 % / 10 % PEG5000¹¹

In einem weiteren Schritt sollte zum einen untersucht werden, wie groß die Spanne der Plasmaverweilzeiten konventioneller und sterisch stabilisierter Liposomen, speziell im Hinblick auf die hier untersuchte Liposomenformulierung ist und zum anderen, inwieweit Unterschiede in den Organverteilungen zu beobachten sind. Daher wurden AVE3-Formulierungen mit 2,5 %, 5 %, 7,5 % oder 10 % PEG-PE entwickelt.

Die Abbildung 2.16. zeigt einen deutlichen Trend zu längeren Plasmaverweildauern mit zunehmenden PEG-Konzentrationen. Dieser Sachverhalt wird durch die Tabelle 2.2. zahlenmäßig belegt: AVE3 mit 2,5 % PEG zeigten bereits eine etwa doppelt so große Fläche unter der Kurve wie AVE3, während sich durch den Einsatz von 5 % bis 10 % diese Fläche gegenüber AVE3 verdrei- bis vervierfachte. So ließen sich von den PEGylierten Liposomen nach 20 min. je nach eingesetzter Menge noch 40-80 % nachweisen, gegenüber gerade 5 % der nachweisbaren nicht PEGylierten AVE3. Nach 60 min. ließen sich von den PEGylierten AVE3 immerhin noch 13-33 % nachweisen, bei den nicht PEGylierten AVE3 waren es demgegenüber gerade noch 5 %.

¹¹ bei PEG5000 handelt es sich um Polyethylenglykol, welches als hydrophiles Polymer aus zahlreichen Monomeruntereinheiten besteht und ein Molekulargewicht von 5000 Da besitzt.

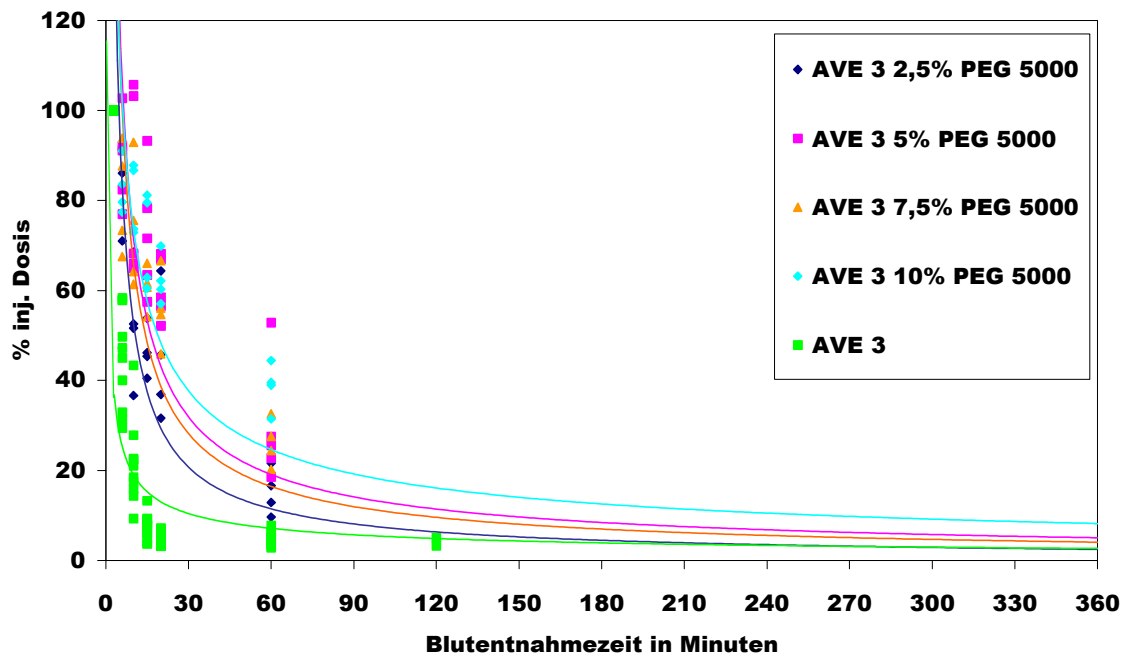


Abb. 2.16. Elimination von AVE3 und AVE3 2,5 % / 5 % / 7,5 % / 10 % PEG5000 aus dem Blut

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE3 (n=19)	1015 +/- 366	5,3 +/- 3,4	5,1 +/- 2,4	4,3 +/- 1,9	3,3 +/- 1,7
AVE3 PEG 2,5% (n=19)	2287 +/- 344	45,9 +/- 10,2	13,0 +/- 6,4	2,8 +/- 0,7	0,7 +/- 0,1
AVE3 PEG 5,0% (n=19)	3436 +/- 1077	53,7 +/- 13,4	28,1 +/- 10,9	2,8 +/- 0,5	1,3 +/- 0,2
AVE3 PEG 7,5% (n=19)	3617 +/- 1274	80,8 +/- 16,8	24,8 +/- 8,1	4,6 +/- 1,0	1,0 +/- 0,3
AVE3 PEG 10,0% (n=19)	3790 +/- 394	63,3 +/- 4,5	33,4 +/- 13,6	13,0 +/- 4,2	2,6 +/- 0,6

Tab. 2.2. Pharmakokinetische Parameter von AVE3 und AVE3 2,5 % / 5 % / 7,5 % / 10 % PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen. Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. .

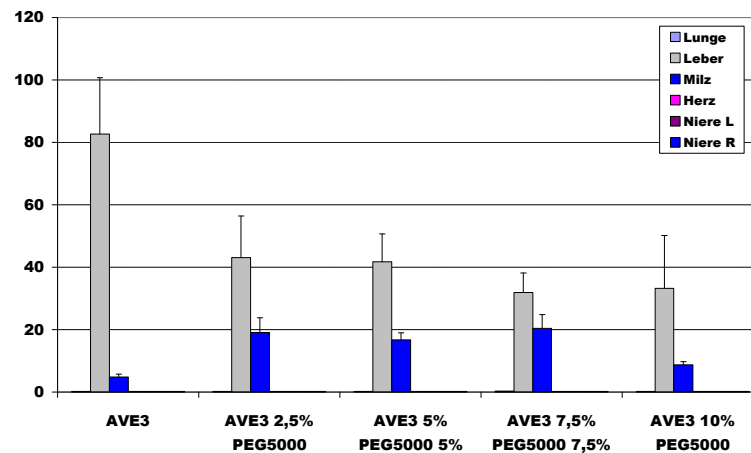


Abb. 2.17. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE3 und AVE3 2,5 % / 5 % / 7,5 % / 10 % PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

Der Abbildung 2.17. ist die Organverteilung der untersuchten Liposomen zu entnehmen. Bei allen PEGylierten AVE3 war die Akkumulation in der Leber mit etwa 40 % deutlich geringer gegenüber 80 % bei AVE3. Ein Unterschied in der Leberakkumulation in Abhängigkeit der eingesetzten PEG-Menge war jedoch nicht zu erkennen. Anders verhielt es sich bei der nachweisbaren Aufnahme in der Milz, die bei den AVE3 mit einer Menge von 2,5 % bis 5 % PEG etwa 20 % gegenüber etwa 5 % bei nicht PEGylierten AVE3 betrug. Bei einer eingesetzten Menge von 10 % PEG sank die Aufnahme in der Milz auf etwa 8 %.

2.2.4.1.3. AVE7, AVE9 UND AVE11 (AVE9 MIT ETWA 3 % PS)

Hier sollte ausgehend von diesen AVE7 - ähnlich wie dies schon im Abschnitt 2.2.4.1.1. für die AVE3 getan wurde - untersucht werden, inwieweit sich ein Austausch von PS gegen PC auf die pharmakokinetischen Parameter und die Organverteilung auswirkt, indem zunächst PS in den AVE9 eliminiert wurde und anschließend in den AVE11 wieder zu etwa 3 % hinzugefügt wurde (die genauen Liposomenformulierungen sind der Tabelle 8.1. zu entnehmen).

Der Abbildung 2.18. sind die Bluteliminationskurven der drei verschiedenen Liposomenformulierungen zu entnehmen. Durch die Substitution von PS in den AVE7 durch PC in den AVE9 wurde ein dramatischer Anstieg der Plasmaverweildauern der AVE9 erzielt. Durch den erneuten Einbau von PS in die AVE11 sank die Plasmaverweildauer ungefähr wieder auf das Niveau der AVE7 ab.

Diese Ergebnisse werden durch die Tabelle 2.3. deutlich belegt: Die Fläche unter der Kurve, die für AVE7 etwa 1000 betrug und für AVE11 etwa 2000 betrug, war für AVE9 demgegenüber etwa fünf- bis zehnfach größer. Insbesondere die für eine spätere Antitumorthherapie interessanten nachweisbaren Blutspiegel waren für AVE9 nach 60 min. bis zu 50 mal höher als für die anderen zwei untersuchten Formulierungen.

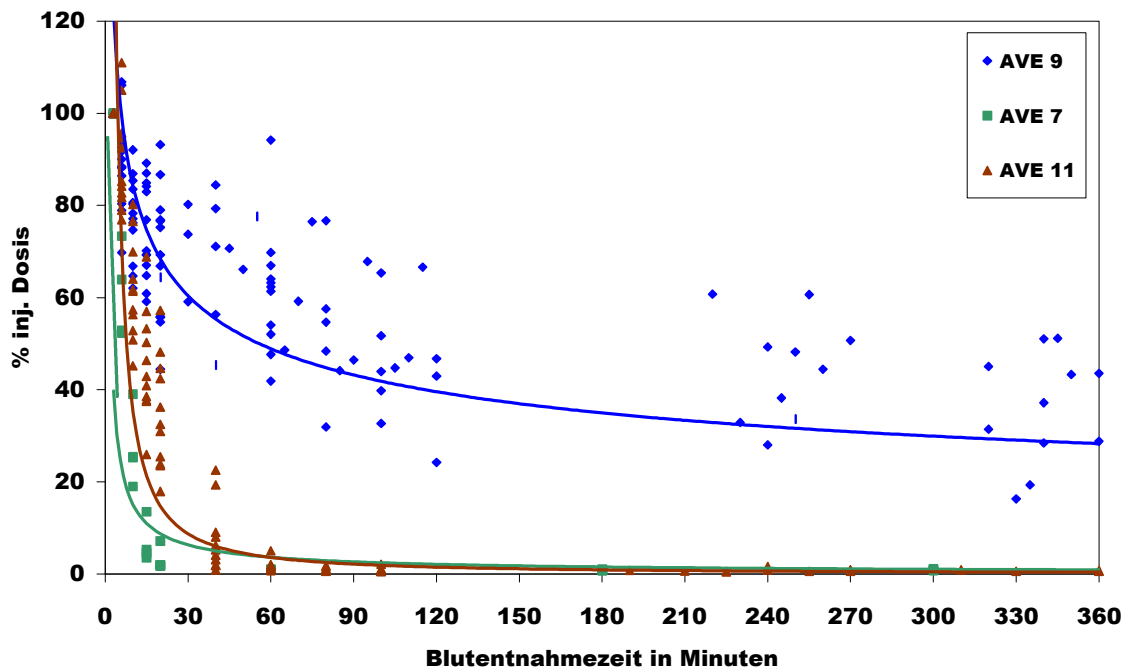


Abb. 2.18. Elimination von AVE7, AVE9 und AVE11 (AVE9 mit etwa 3 % PS) aus dem Blut

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE7 (n=8)	999 +/- 465	6,7 +/- 5,7	1,0 +/- 0,1	0,8 +/- 0,2	0,9 +/- 0,2
AVE9 (n=19)	17485 +/- 3267	71,2 +/- 12,3	62,2 +/- 14,3	51,3 +/- 12,0	38,0 +/- 7,2
AVE11 (n=11)	1790 +/- 386	34,8 +/- 12,2	1,6 +/- 1,2	0,9 +/- 0,4	0,7 +/- 0,3

Tab. 2.3. Pharmakokinetische Parameter von AVE7, AVE9 und AVE11 (AVE9 mit 0,2 % PS)

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen. Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. .

Die Abbildung 2.19. verdeutlicht die Organverteilungen der AVE7, die mit etwa 80 % stark in der Leber akkumulierten und zu etwa 8 % in der Milz. Besonders deutlich war im Gegensatz hierzu die auf weniger als 14 % reduzierte Leberakkumulation der AVE9 mit einer Aufnahme von nur etwa 3

% in der Milz. Durch die Zugabe von etwa 3 % PS in den AVE11 stieg die Leberakkumulation wieder auf etwa 40 % an und auch die Aufnahme in der Milz erreichte das Niveau von etwa 8 %. Die nachweisbare Aufnahme in alle übrigen Organe betrug für AVE7 weniger als 0,2 % und für AVE9 und AVE11 weniger als 0,8 %.

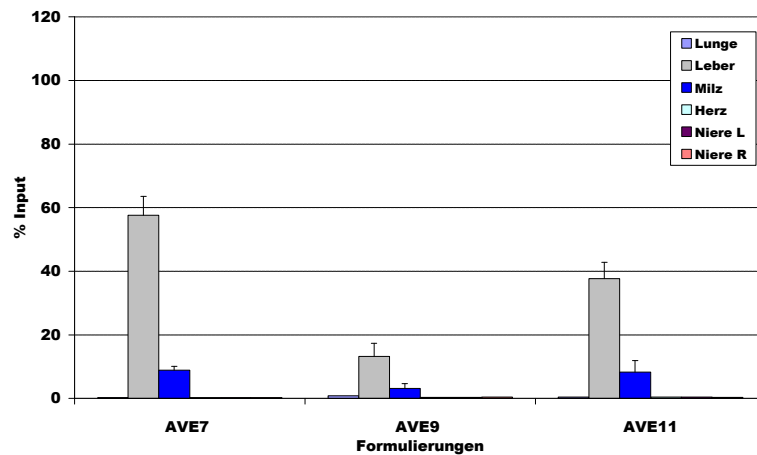


Abb. 2.19. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE7, AVE9 und AVE11 (AVE9 mit 0,2 % PS)

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

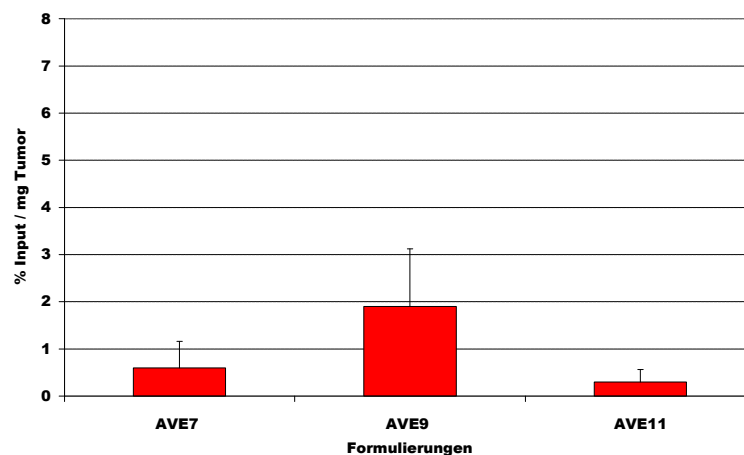


Abb. 2.20. Tumorakkumulation nach 6 Stunden von AVE7, AVE9 und AVE11 (AVE9 mit etwa 3 % PS)

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.15. .

Die Abbildung 2.20. vergleicht die Akkumulation der drei verschiedenen Liposomenformulierungen im Tumor. Lediglich AVE9 zeigten eine Akkumulation von fast 2 % pro Gramm Tumorgewebe, während die Akkumulation der übrigen Formulierungen mit deutlich unter 1 % pro Gramm Tumorgewebe dahinter zurückblieb.

2.2.4.1.4. AVE7 UND DECOYSTRATEGIE

Insbesondere vor dem Hintergrund der Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts 2.2.4.1.3. sollte exemplarisch für AVE7 mittels der sogenannten Decoystrategie (engl., decoy: Köder, Lockvogel) untersucht werden, inwieweit die pharmakokinetischen Parameter und die Organverteilung abhängig von der injizierten Liposomenmenge sind. Hierzu wurden etwa 5 min. vor der Injektion radioaktiv markierter AVE7 1000 nmol, 3000 nmol oder 5000 nmol nicht radioaktiv markierte AVE7 injiziert.

Es ergab sich eine leichte Veränderung zugunsten längerer Halbwertszeiten für die Decoystrategie, insbesondere wenn 5000 nmol AVE7 präinjiziert worden waren (siehe hierzu Abbildung 2.21. auf der nächsten Seite).

Die Tabelle 2.4. (s. nächste Seite) bestätigt diese Ergebnisse, da für die Decoystrategie mit 1000 nmol und 3000 nmol die Flächen unter den Kurven etwa 2-3 mal größer waren, bei den 5000 nmol war die Fläche sogar fast fünfmal so groß wie bei den AVE7 ohne Präinjektion. Auch die nachweisbaren Mengen im Blut waren mit der Decoystrategie zu allen Zeitpunkten mindestens 5-10 mal höher als ohne Decoystrategie.

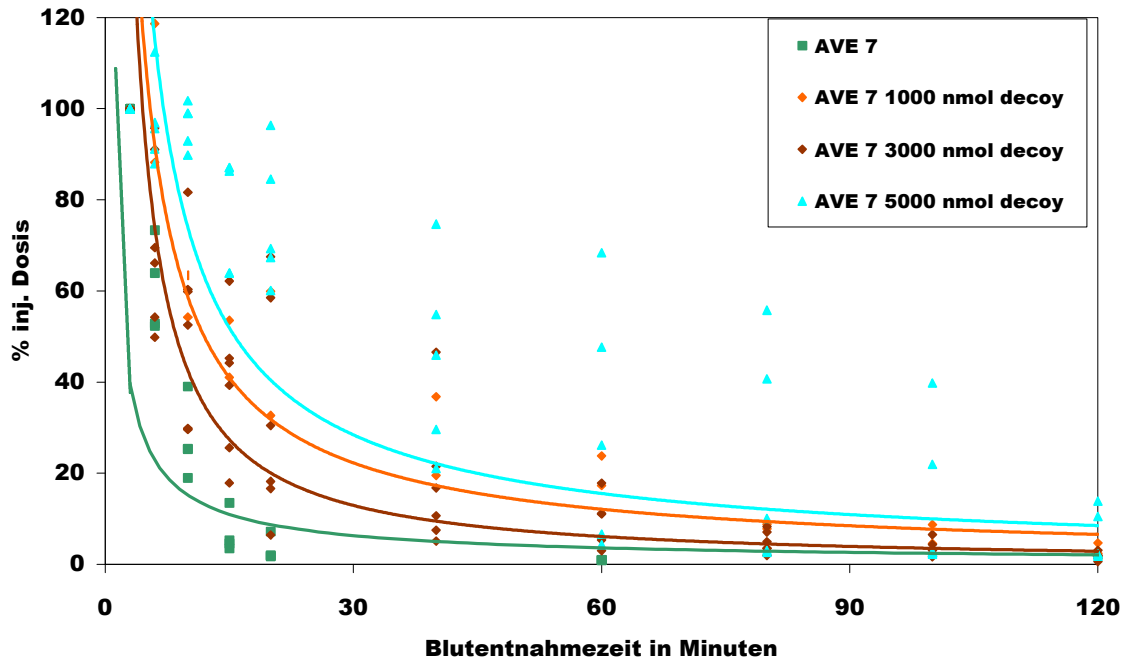


Abb. 2.21. Elimination von AVE7 ohne vorherige Präinjektion und AVE7 mit vorheriger Präinjektion von 1000 nmol, 3000 nmol oder 5000 nmol AVE7

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE7 (n=8)	999 +/- 465	6,7 +/- 5,7	1,0 +/- 0,1	0,8 +/- 0,2	0,9 +/- 0,2
AVE7 decoy 1000nmol (n=4)	2970 +/- 477	54,6 +/- 15,2	17,5 +/- 5,1	3,0 +/- 1,2	
AVE7 decoy 3000nmol (n=4)	2084 +/- 1004	33,2 +/- 23,7	10,0 +/- 5,8	1,7 +/- 1,0	
AVE7 decoy 5000nmol (n=5)	4560 +/- 1949	75,5 +/- 14,6	30,6 +/- 27,4	6,2 +/- 5,6	

Tab. 2.4. Pharmakokinetische Parameter von AVE7 ohne vorherige Präinjektion und AVE7 mit vorheriger Präinjektion von 1000 nmol, 3000 nmol oder 5000 nmol AVE7

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen. Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. .

Wie aus der Abbildung 2.22. ersichtlich, haben sich die Organverteilungen der AVE7 in Abhängigkeit von der Decoystrategie nicht wesentlich unterschieden: Alle Formulierungen zeigten eine 60-80 % ige Leberakkumulation und eine Aufnahme in der Milz von 10-20 %. Lediglich im Falle einer Präinjektion von 5000 nmol war eine geringere Leberakkumulation von etwa 40 % zu erkennen. Die nachweisbare

Aufnahme in allen übrigen Organen betrug für alle Formulierungen weniger als 0,4 %.

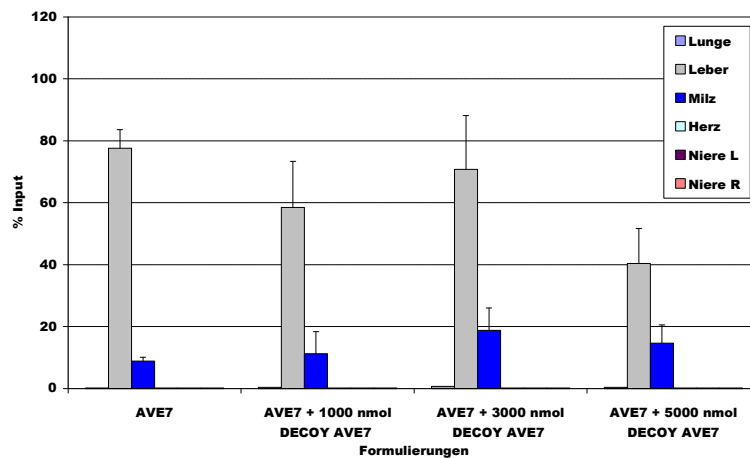


Abb. 2.22. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE7 und AVE7 nach Präinjektion von 1000 nmol, 3000 nmol oder 5000 nmol AVE7

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

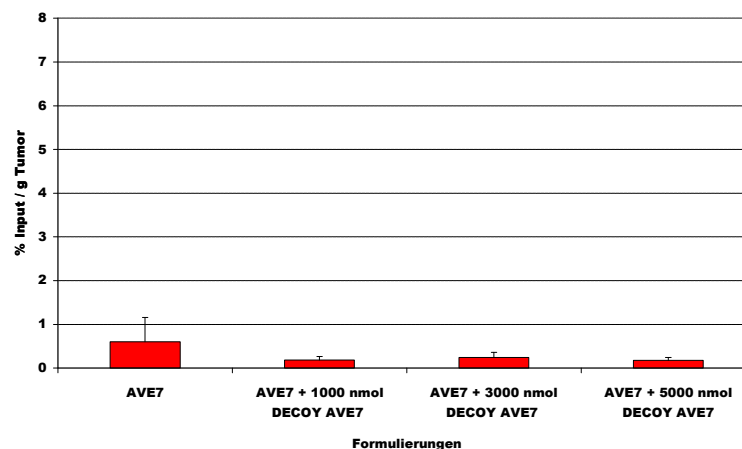


Abb. 2.23. Tumorakkumulation nach 6 Stunden von AVE7 und AVE7 nach Präinjektion von 1000 nmol, 3000 nmol oder 5000 nmol AVE7

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 4 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.15. .

Insbesondere konnte auch die Tumorakkumulation der AVE7 nicht wesentlich dadurch verbessert werden, dass präinjiziert wurde (siehe hierzu Abbildung 2.23.). Tatsächlich sank die Akkumulation sogar von unter 0,6 % auf unter 0,3 % pro Gramm Tumorgewebe nach Präinjektion.

2.2.4.1.5. EINFLUß DES CHOLESTEROLS: AVE9 UND AVE9' (10% CHOL) BIS AVE9'''' (50 % CHOL)

Ausgehend von AVE9 als einer lang zirkulierenden konventionellen Formulierung mit einer geringen Aufnahme in Leber und Milz sowie einer deutlichen Akkumulation im Tumorgewebe sollte nachfolgend der Versuch unternommen werden, durch Variation unterschiedlicher Lipidkomponenten die Formulierung weitergehend zu optimieren und den Einfluß der Variationen auf die Pharmakokinetik sowie die Organverteilung und Tumorakkumulation zu untersuchen. Zunächst sollte hierzu der Einfluß des Cholesterols untersucht werden. Dazu wurde ausgehend von den AVE9 mit einem Chol-Gehalt von 35 % die Chol-Menge variiert von 10 % Chol in AVE9' bis 50% Chol in AVE9'''' (s. hierzu Tabelle 8.2.).

Insbesondere der Einsatz geringerer Mengen als 30 % Chol führte zu einer deutlich schnelleren Elimination aus dem Blut, wohingegen der Einsatz von Mengen von 30-50 % Chol keinen Einfluß auf das pharmakokinetische Verhalten der Liposomen hatte (siehe hierzu Abbildung 2.24.).

Die Tabelle 2.5. verdeutlicht, dass die AVE9' mit einer Halbwertszeit von nur etwa 160 min. gegenüber den 300 min. der AVE9 und einer etwa um die Hälfte reduzierten Fläche unter der Kurve deutlich ungünstigere pharmakokinetische Parameter infolge der Chol-Reduzierung zeigten, zumal die nachweisbaren Mengen im Blut für die AVE9' für alle Zeitpunkte für mindestens 15-20 % hinter denen der AVE9 zurückblieben.

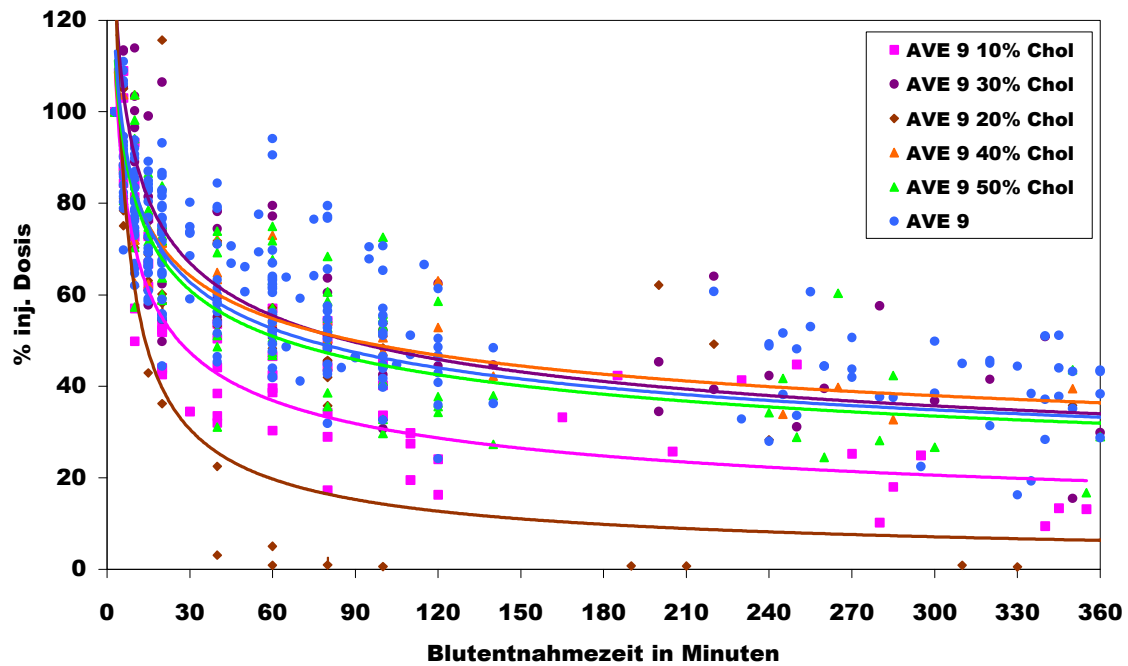


Abb. 2.24. Elimination von AVE9 UND AVE9' (10% CHOL) BIS AVE9'''' (50 % CHOL)

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 5 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	tH	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE9 (n=19)	303,7 +/- 66,3	17485 +/- 3267	71,2 +/- 12,3	62,2 +/- 14,3	51,3 +/- 12,0	38,0 +/- 7,2
AVE9 10% Chol (n=6)	164,6 +/- 39,7	9257 +/- 1893	48,0 +/- 5,1	42,5 +/- 8,9	31,5 +/- 10,5	24,6 +/- 15,3
AVE9 20% Chol (n=5)	271,2 +/- 102,4	14671 +/- 4104	73,0 +/- 24,8	50,1 +/- 4,3	40,8 +/- 10,0	34,3 +/- 11,9
AVE9 30% Chol (n=5)	219,5 +/- 90,8	15383 +/- 3026	68,5 +/- 22,5	63,4 +/- 13,7	53,4 +/- 9,2	32,0 +/- 14,9
AVE9 40% Chol (n=5)	205,3 +/- 30,8	13308 +/- 2304	64,6 +/- 10,4	54,7 +/- 11,4	47,3 +/- 12,4	31,7 +/- 6,5
AVE9 50% Chol (n=8)	249,6 +/- 73,4	15770 +/- 3738	69,3 +/- 8,4	59,9 +/- 11,1	41,0 +/- 10,3	30,3 +/- 9,9

Tab. 2.5. Pharmakokinetische Parameter von AVE9 UND AVE9' (10% CHOL) BIS AVE9'''' (50 % CHOL)

Die Halbwertszeit tH wurde für die Werte von 3 min. bis 360 min. ausgehend von einer monophasischen exponentiellen Elimination berechnet, wobei eine eventuell biphasische Elimination unberücksichtigt bleibt. Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen.

Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. .

Die Abbildungen 2.25. und 2.26. veranschaulichen, dass sich weder Unterschiede in der Organverteilung noch in der Tumorakkumulation infolge einer Variation des Chol-Gehalts ergaben: Alle Liposomen zeigten eine Leberakkumulation von etwa 15-40 % und eine Aufnahme in der Milz

von etwa 5-10 %. Die nachweisbare Aufnahme in allen übrigen Organen betrug für alle Formulierungen weniger als 0,7 %. Die Tumorakkumulation betrug ohne einen erkennbaren Trend jeweils etwa 1-3 % pro Gramm Tumorgewebe.

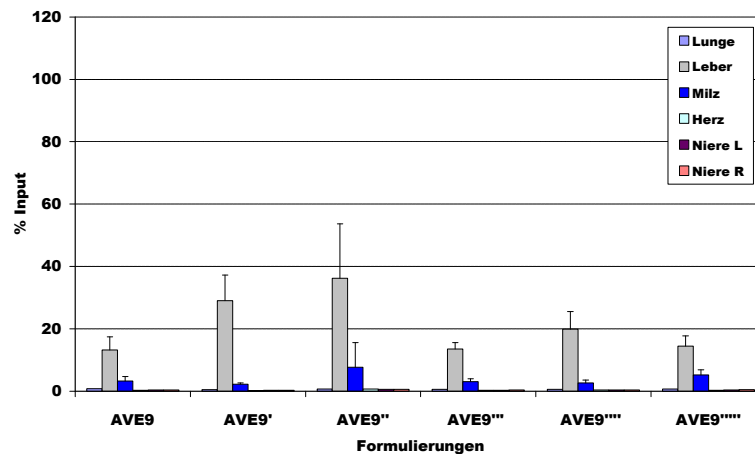


Abb. 2.25. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE9 UND AVE9' (10 % CHOL) BIS AVE9'''''' (50 % CHOL)

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 5 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

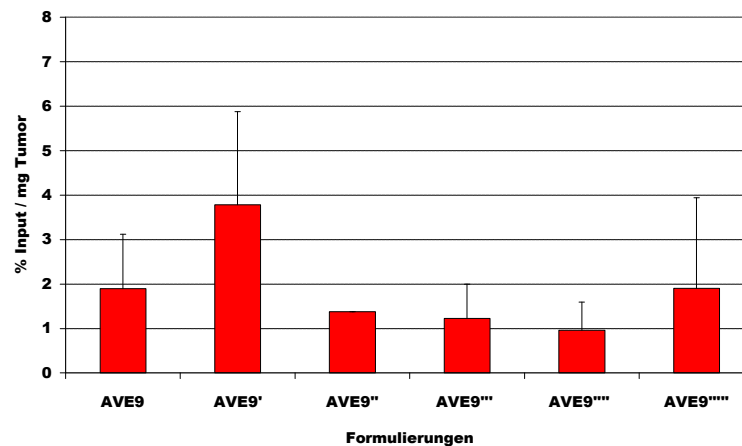


Abb. 2.26. Tumorakkumulation nach 6 Stunden von AVE9 UND AVE9' (10 % CHOL) BIS AVE9'''''' (50 % CHOL)

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 5 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.15. .

2.2.4.1.6. EINFLUß DER FETTSÄUREN UND DES PE: AVE9 DPPC, AVE9 DPPE, AVE9 SSM UND AVE9 0 % PE

Nach der Untersuchung des Cholesterolgehalts im vorhergehenden Abschnitt sollte nachfolgend der Einfluß unterschiedlicher Fettsäureketten in den verwendeten Lipiden untersucht werden. Diese besitzen eine unterschiedliche Länge und können zudem ungesättigt oder gesättigt sein. Bei den verwendeten Phospholipiden in AVE9 handelt es sich zum einen um POPC, also um ein PC mit einem gesättigten Palmitinsäurerest aus 16 Kohlenstoffatomen (16:0) und einem einfach ungesättigten Ölsäurerest aus 18 Kohlenstoffatomen (18:1) sowie zum anderen um DLPE, also um ein PE mit zwei gesättigten Laurinsäureresten aus 12 Kohlenstoffatomen (12:0). Letzter Phospholipidbaustein ist natürliches SM, isoliert aus Kuhmilch, welches als Gemisch von Sphingomyelinen mit unterschiedlichen, in der Regel jedoch gesättigten Fettsäureketten aus 16 bis 24 Kohlenstoffatomen vorliegt.

Zunächst wurde POPC ausgetauscht gegen DPPC (AVE9 DPPC): Bei DPPC handelt es sich um ein PC mit zwei gesättigten Palmitinsäureresten aus 16 Kohlenstoffatomen (16:0). In einer weiteren Formulierung wurde DLPE ausgetauscht gegen DPPE (AVE9 DPPE): Bei DPPE handelt es sich um ein PE, ebenfalls mit zwei gesättigten Palmitinsäureresten aus 16 Kohlenstoffatomen (16:0). Außerdem wurde schließlich das natürliche SM substituiert gegen SSM (AVE9 SSM), in dem der Sphingomyelingrundkörper ausschließlich mit einem gesättigten Stearinsäurerest aus 18 Kohlenstoffatomen (18:0) verestert ist.

Abschließend wurde noch der Einfluß des PE per se untersucht, indem es gänzlich aus der Formulierung der AVE9 eliminiert und durch PC ersetzt wurde (AVE9 0% PE) (Einzelheiten zu den Zusammensetzungen sind den Tabellen 8.3. und 8.4. sowie 8.5. zu entnehmen).

Wie aus der Abbildung 2.27. ersichtlich, übte keine der Variationen der Formulierung einen erkennbaren Einfluß auf das pharmakokinetische Verhalten der Liposomen aus. Keine der Variationen wich wesentlich von den AVE9 ab und auch aus der Tabelle 2.6. ergeben sich keine wesentlich veränderten pharmakokinetischen Parameter. Die Halbwertszeiten lagen im ähnlichen Bereich von deutlich über 200 min. bis zu über 300 min. und auch die nachweisbaren Mengen im Blut lagen nach 20 min. für alle Liposomen im Bereich von über 60 % bis 80 % und nach 360 min. bei 30-40 %.

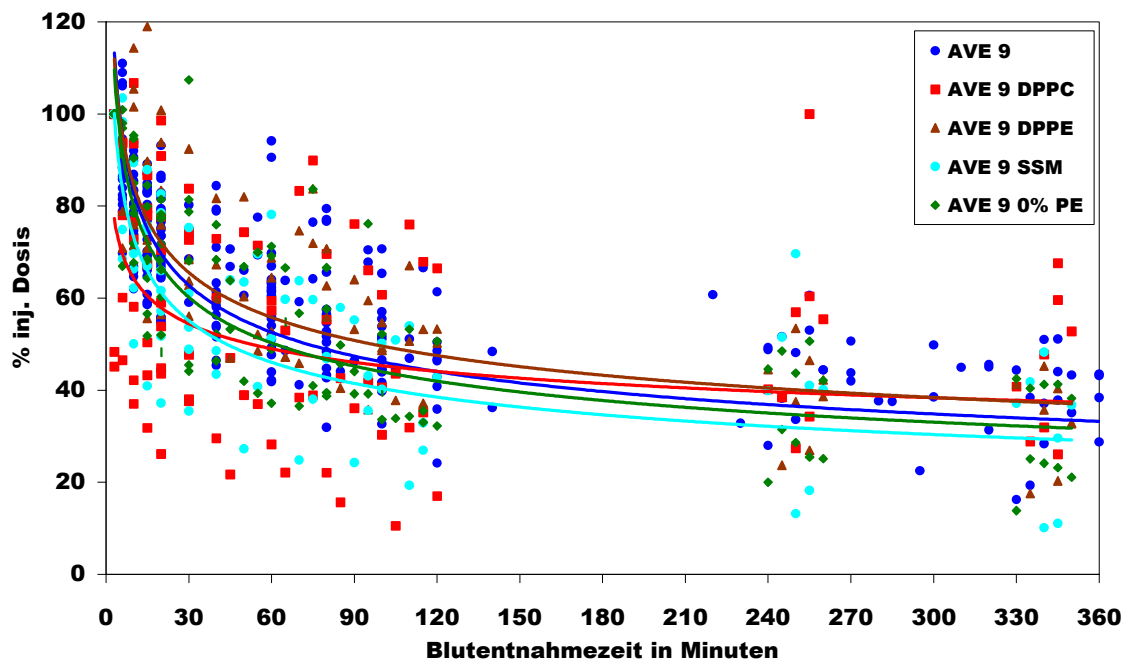


Abb. 2.27. Elimination von AVE9 DPPC, AVE9 DPPE, AVE9 SSM, UND AVE9 0 % PE
Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	tH	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE9 (n=19)	303,7 +/- 66,3	17485 +/- 3267	71,2 +/- 12,3	62,2 +/- 14,3	51,3 +/- 12,0	38,0 +/- 7,2
AVE9 DPPC (n=12)	250,6 +/- 145,3	12012 +/- 6577	55,6 +/- 24,1	43,5 +/- 19,2	38,2 +/- 21,4	30,1 +/- 18,6
AVE9 DPPE (n=8)	243,6 +/- 54,6	16577 +/- 3321	80,6 +/- 13,2	59,5 +/- 11,9	50,5 +/- 9,6	33,3 +/- 9,9
AVE9 SSM (n=7)	301,8 +/- 158,4	14478 +/- 4810	62,4 +/- 15,4	55,8 +/- 17,5	39,6 +/- 13,4	30,7 +/- 14,8
AVE9 0% PE (n=10)	226,4 +/- 51,6	14539 +/- 3303	68,1 +/- 11,5	56,6 +/- 13,8	42,9 +/- 11,6	31,1 +/- 10,7

Tab. 2.6. Pharmakokinetische Parameter von AVE9 DPPC, AVE9 DPPE, AVE9 SSM, UND AVE9 0 % PE

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen. Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. und Tabelle 2.5. .

Auch für die Organverteilungen der unterschiedlichen Formulierungen ergaben sich keine deutlichen Unterschiede (siehe Abbildung 2.28.): Alle Formulierungen zeigten eine Leberakkumulation von 15-20 % und eine Aufnahme in der Milz von 3-6 %. Für alle Formulierungen betrug die nachweisbare Aufnahme in alle übrigen Organe unter 1 %.

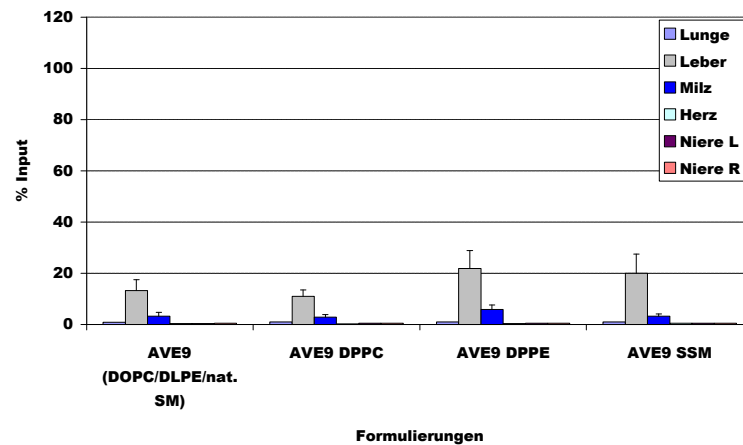


Abb. 2.28. Organverteilung nach 6 Stunden von AVE9 DPPC, AVE9 DPPE, AVE9 SSM, UND AVE9 0 % PE

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

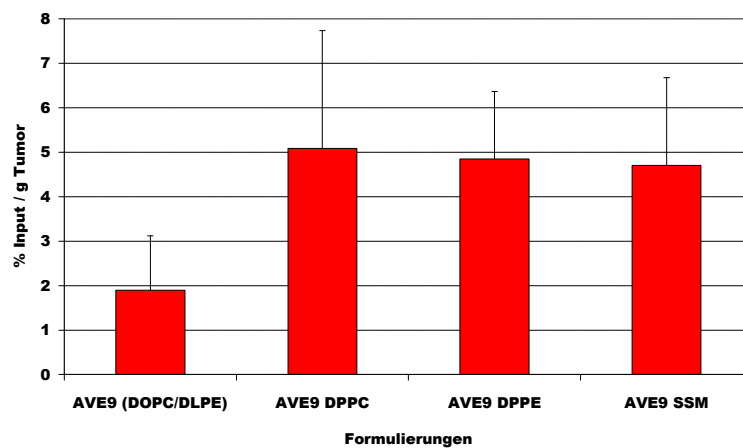


Abb. 2.29. Tumorakkumulation nach 6 Stunden von AVE9 DPPC, AVE9 DPPE, AVE9 SSM, UND AVE9 0 % PE

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.15. .

Die Abbildung 2.29. verdeutlicht die Tumorakkumulation der unterschiedlichen Formulierungen. Alle Formulierungen zeigten als Variationen der Formulierung der AVE9 eine deutliche Akkumulation von über 2 % pro Gramm Tumorgewebe. AVE9 DPPC, AVE9 DPPE und AVE9 SSM zeigten sogar eine Akkumulation von bis zu mehr als 5 % pro Gramm Tumorgewebe.

2.2.4.1.7. EINFLUß DES SM UND EINER PEGYLIERUNG, VERGLEICH MIT STANDARDLIPOSOMEN: AVE9, AVE9 0% - 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0% SM 5 % PEG5000 UND DPPC/CHOL 5% PEG5000

Abschließend sollte zum einen der Einfluß des SM auf AVE9 untersucht werden. Dazu wurde ausgehend von etwa 18 % in AVE9 der SM Gehalt entweder auf 0 % (AVE9 0% SM) oder 5 % (AVE9 5 % SM) reduziert oder auf 30 % erhöht (AVE9 30 % SM). Zum anderen sollte auch die Wirkung einer PEGylierung untersucht werden, um - ähnlich wie dies bereits im Abschnitt 2.2.4.1.2. für die AVE3 getan wurde - auch für AVE9 die Spanne der Plasmaverweilzeiten zwischen einer konventionellen und einer sterisch stabilisierten Formulierung einschätzen zu können und um zu untersuchen, inwieweit es Unterschiede in der Organverteilung und Tumorakkumulation gibt. Hierzu wurden 5 % PEG eingesetzt (AVE9 5 % PEG5000). Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit sich durch eine PEGylierung der Einsatz des SM ausgleichen lässt: dazu wurden AVE9 ohne SM mit ebenfalls 5 % PEG eingesetzt. Um die Ergebnisse beurteilen zu können, wurden die Formulierungen mit einer PEGylierten Standard-Formulierung aus DPPC und Chol verglichen (DPPC/Chol 5 % PEG5000), die als DOXIL® bereits für den Handel zugelassen ist.

Sowohl die Blutkinetik der AVE9 5 % SM als auch der AVE9 0 % SM PEG 5000 war nahezu deckungsgleich mit der Kinetik der AVE9. Insbesondere die

Elimination des SM aus der Formulierung der AVE9 sowie die Erhöhung des SM-Gehaltes auf 30 % führte jedoch zu einer deutlich verkürzten Blutverweildauer (siehe hierzu Abbildung 2.30.). Auch die untersuchten sterisch stabilisierten Standardliposomen zeigten eine kürzere Verweildauer im Blut als die AVE9. Ausschließlich die AVE9 5 % PEG5000 zeigten eine Blutkinetik, die oberhalb jener der AVE9 lag.

Die AVE9 5 % PEG5000 zeigten mit über 430 min. die längste Halbwertszeit aller untersuchten Formulierungen (siehe hierzu Tabelle 2.7.). Insbesondere zeigten auch die nachweisbaren Mengen im Blut für alle untersuchten Zeitpunkte mit die höchsten Werte für diese Formulierung. Für alle untersuchten Formulierungen konnten auch nach 360 min. noch deutlich über 20 % der injizierten Menge nachgewiesen werden.

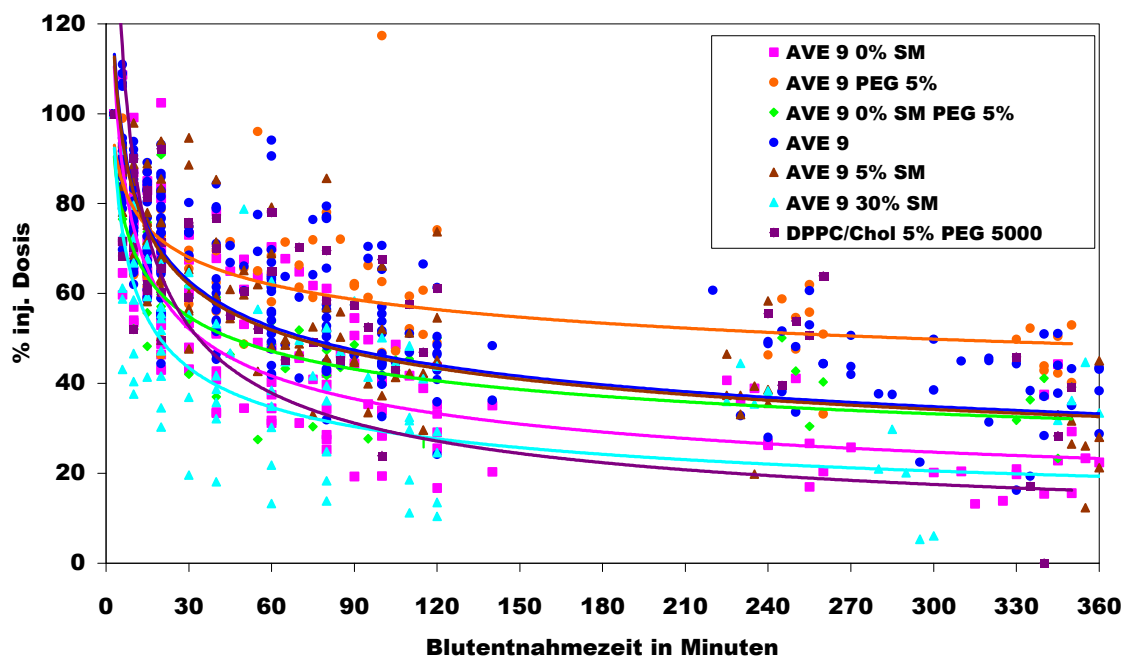


Abb. 2.30. Elimination von AVE9, AVE9 0% - 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0% SM 5 % PEG5000 und DPPC/Chol 5% PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.13. .

Liposomen	tH	AUC	p20	p60	p120	p360
AVE9 (n=19)	303,7 +/- 66,3	17485 +/- 3267	71,2 +/- 12,3	62,2 +/- 14,3	51,3 +/- 12,0	38,0 +/- 7,2
AVE9 0% SM (n=17)	196,6 +/- 63,0	12623 +/- 3218	65,8 +/- 15,1	48,5 +/- 13,4	38,2 +/- 11,7	23,5 +/- 8,4
AVE9 5% SM (n=11)	218,4 +/- 52,2	15094 +/- 3722	68,9 +/- 13,2	51,7 +/- 12,8	46,7 +/- 13,3	27,2 +/- 9,2
AVE9 30% SM (n=11)	242,4 +/- 89,8	12424 +/- 3677	55,3 +/- 13,5	42,5 +/- 13,5	36,9 +/- 13,8	22,9 +/- 11,3
AVE9 5% PEG5000 (n=5)	433,0 +/- 71,6	17098 +/- 3030	67,0 +/- 14,0	68,9 +/- 11,7	56,2 +/- 9,4	46,8 +/- 5,1
AVE9 0%SM PEG 5% (n=8)	322,7 +/- 56,6	14456 +/- 2464	64,6 +/- 14,8	45,6 +/- 9,4	41,9 +/- 9,0	34,4 +/- 7,1
DPPC/Chol-PEG (n=9)	320,5 +/- 83,7	16747 +/- 3190	67,8 +/- 15,8	60,1 +/- 12,6	47,6 +/- 14,9	40,6 +/- 14,2

Tab. 2.7. Pharmakokinetische Parameter von AVE9, AVE9 0% - 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0% SM 5 % PEG5000 und DPPC/Chol 5% PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von n Mäusen. Nähere Angaben zur Auswertung siehe Legende zur Tabelle 2.1. und Tabelle 2.5. .

Die Abbildung 2.31. zeigt keine wesentlichen Unterschiede in der Organverteilung in Abhängigkeit von der variierten Menge an SM. Die Leberakkumulation betrug für alle Formulierungen etwa 15 %, die Aufnahme in der Milz betrug 4-5 %.

Auch die untersuchten Standardliposomen (DPPC/Chol 5 % PEG5000) zeigten eine Leberakkumulation, die mit 16 % vergleichbar war mit derjenigen der AVE9. Ihre Aufnahme lag mit etwa 1,8 % etwas unter der der AVE 9 mit 3 %.

Sowohl die Leberakkumulation als auch die Aufnahme der AVE9 in der Milz konnten durch die untersuchte PEGylierung weiter reduziert werden (Leberakkumulation: 7 %, Aufnahme in der Milz: 1,3 %).

Die untersuchten AVE9 ohne SM aber mit einer PEGylierung (AVE9 0 % SM 5 % PEG5000) zeigten im Vergleich zu den AVE9 keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Organverteilung, die Leberakkumulation betrug unter 20 % und die Aufnahme in der Milz war mit unter 3 % gering.

Für alle in diesem Abschnitt untersuchten Formulierungen betrug die nachweisbare Aufnahme in andere Organe unter 0,9 %.

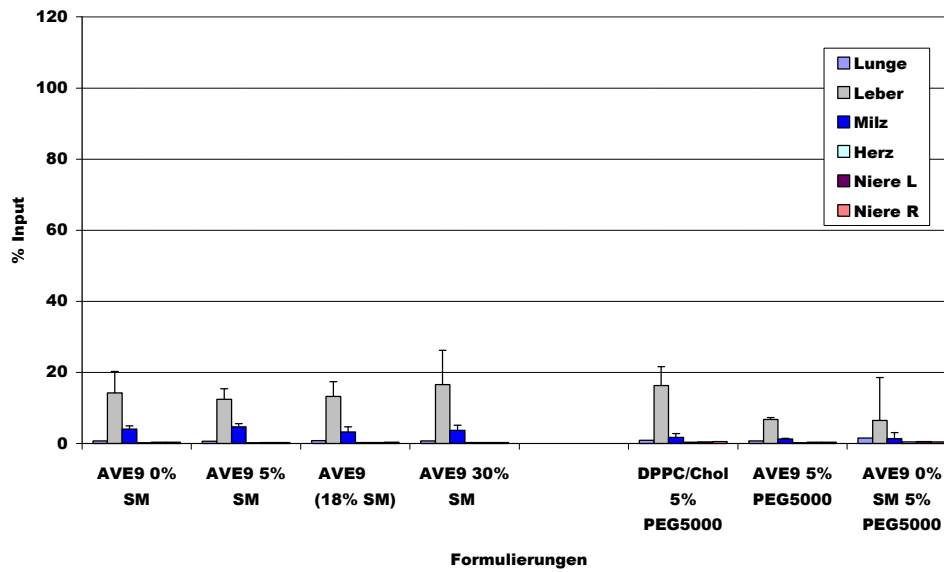


Abb. 2.31. Organverteilung von AVE9, AVE9 0% - 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0% SM 5 % PEG5000 und DPPC/Chol 5% PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung siehe Legende zur Abbildung 2.14. .

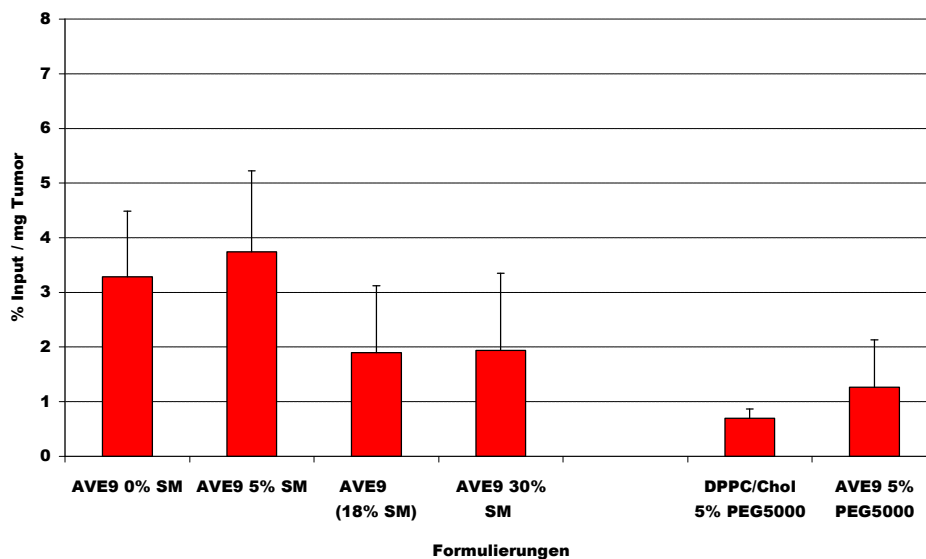


Abb. 2.32. Tumorakkumulation von AVE9, AVE9 0% - 30% SM, AVE9 5 % PEG5000, AVE9 0% SM 5 % PEG5000 und DPPC/Chol 5% PEG5000

Abgebildet sind die Ergebnisse von je mind. 6 Mäusen. Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung siehe Legende zur Abbildung 2.15. .

Der Abbildung 2.32. (auf der vorhergehenden Seite) ist zu entnehmen, dass die Tumorakkumulation im Falle niedriger SM-Konzentrationen in den AVE9-Formulierungen - also AVE9 0% SM sowie AVE9 5% SM - eine höhere Tumorakkumulation von 3-4 % je Gramm Tumorgewebe zeigten als im Falle höherer SM-Konzentrationen - also AVE9 (18 % SM) sowie AVE9 30% SM mit jeweils unter 2 % je Gramm Tumorgewebe.

Die untersuchten DPPC/Chol-Standardliposomen zeigten eine im Vergleich zu AVE9 geringere Tumorakkumulation von unter 1 %. Die AVE9 mit einer Pegylierung zeigten eine Akkumulation im Tumor, die mit etwas über 1 % geringer war als die der AVE9.

2.2.4.2. ORGANVERTEILUNG UND TUMORAKKUMULATION RHODAMIN-MARKIERTER AVE3 UND AVE9

Um die Organverteilungen mikroskopisch zu visualisieren, wurden 2000 nmol Rhodamin-markierte AVE3 und AVE9 intravenös in MeWo-Tumor-tragende Nacktmäuse injiziert. Nach 6 h wurden die Mäuse getötet und die Organe zur Herstellung von Kryoschnitten präpariert (s. Abschnitt 6.7.3.4.).

Die Abbildung 2.33. (auf der nächsten Seite) zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder der Kryoschnitte von Lunge, Leber, Milz und Tumor für AVE3 und AVE9 in jeweils 100-facher Vergrößerung. Beide Formulierungen ließen sich nicht in der Lunge nachweisen.

Sowohl AVE3 als auch AVE9 wurden von der Milz und der Leber aufgenommen, es sind deutliche Fluoreszenzen im gesamten Organ nachweisbar.

Ausschließlich AVE9 zeigten jedoch auch im Tumor deutliche arealweise Fluoreszenzen, die für AVE3 nur sehr vereinzelt und am Rand des Tumors auftraten.

Um die Akkumulation insbesondere von AVE9 zu untersuchen, wurden je 2000 nmol Rhodamin-markierte Liposomen intravenös in Nacktmäuse mit verschiedenen Tumoren (A549¹², BSF1, C6, colon26) injiziert. Die Auswahl der Tumore erfolgte aufgrund ihrer recht ausgeprägten und mit bloßem Auge am lebenden Tier erkennbaren Vaskularisierung.

Für alle Tumore mit Ausnahme der BSF1 sind deutlich fluoreszierende Areale insbesondere im Bereich gefäßartiger Hohlräume zu erkennen (siehe Abbildung 2.34. auf der übernächsten Seite). Deutlich erkennbar ist auch bei dem BSF1-Tumor eine Ansammlung von punktförmigen Fluoreszenzen im Innern eines solchen Hohlraumes.

¹² Zelllinien: A549: humanes Lungenkarzinom; BSF1: murines Fibrosarkom; C6: Rattenglioblastom; colon26: murines Kolonkarzinom

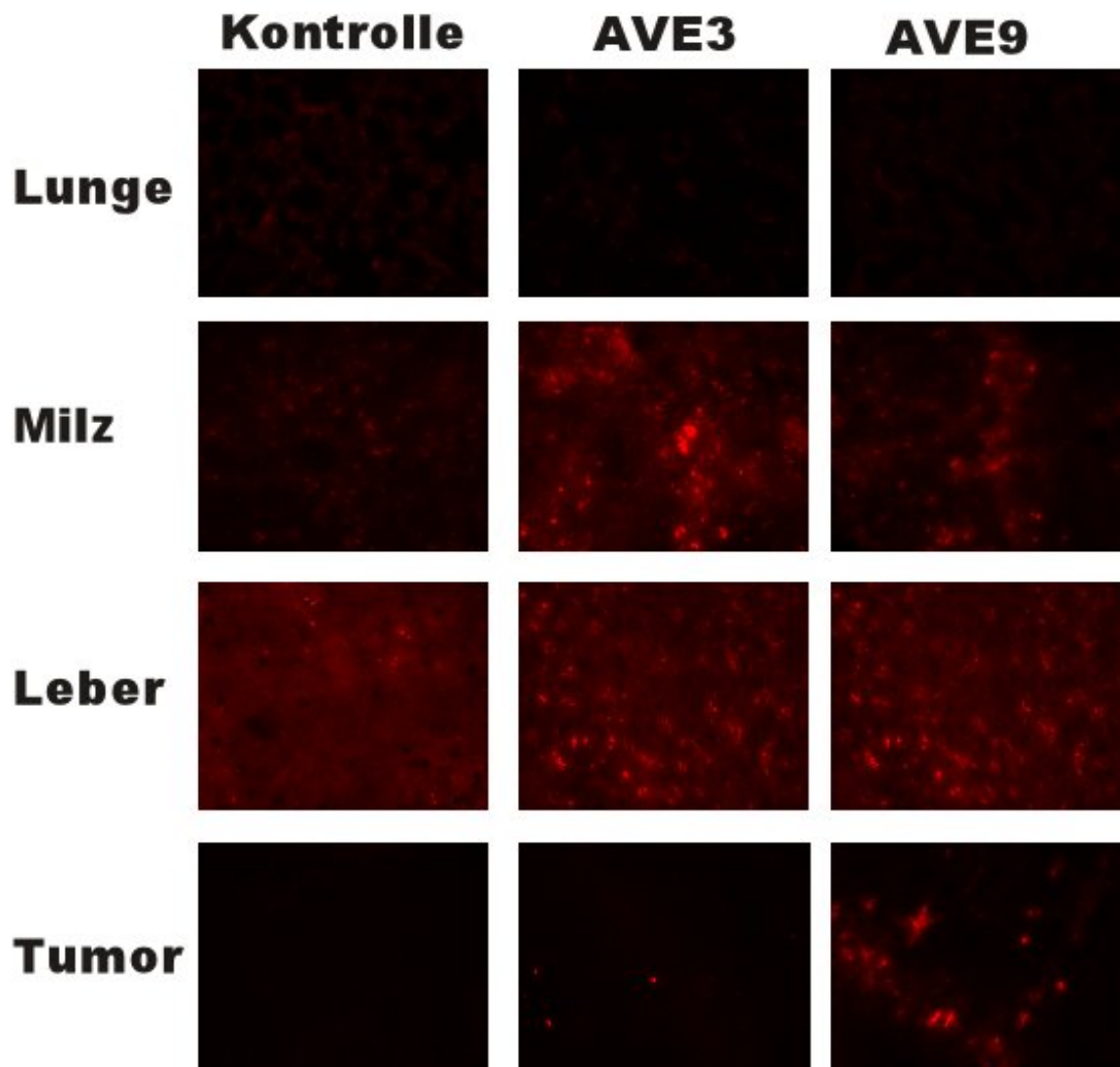


Abb. 2.33. Organverteilung und Tumorakkumulation von Rhodamin-markierten AVE3 und AVE9

Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten verschiedener Organe bei 100-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungsdauer von 5 Sekunden. Als Negativkontrolle wurde eine Maus nicht injiziert. Tumorzelllinie: MeWo (humanes Melanom)

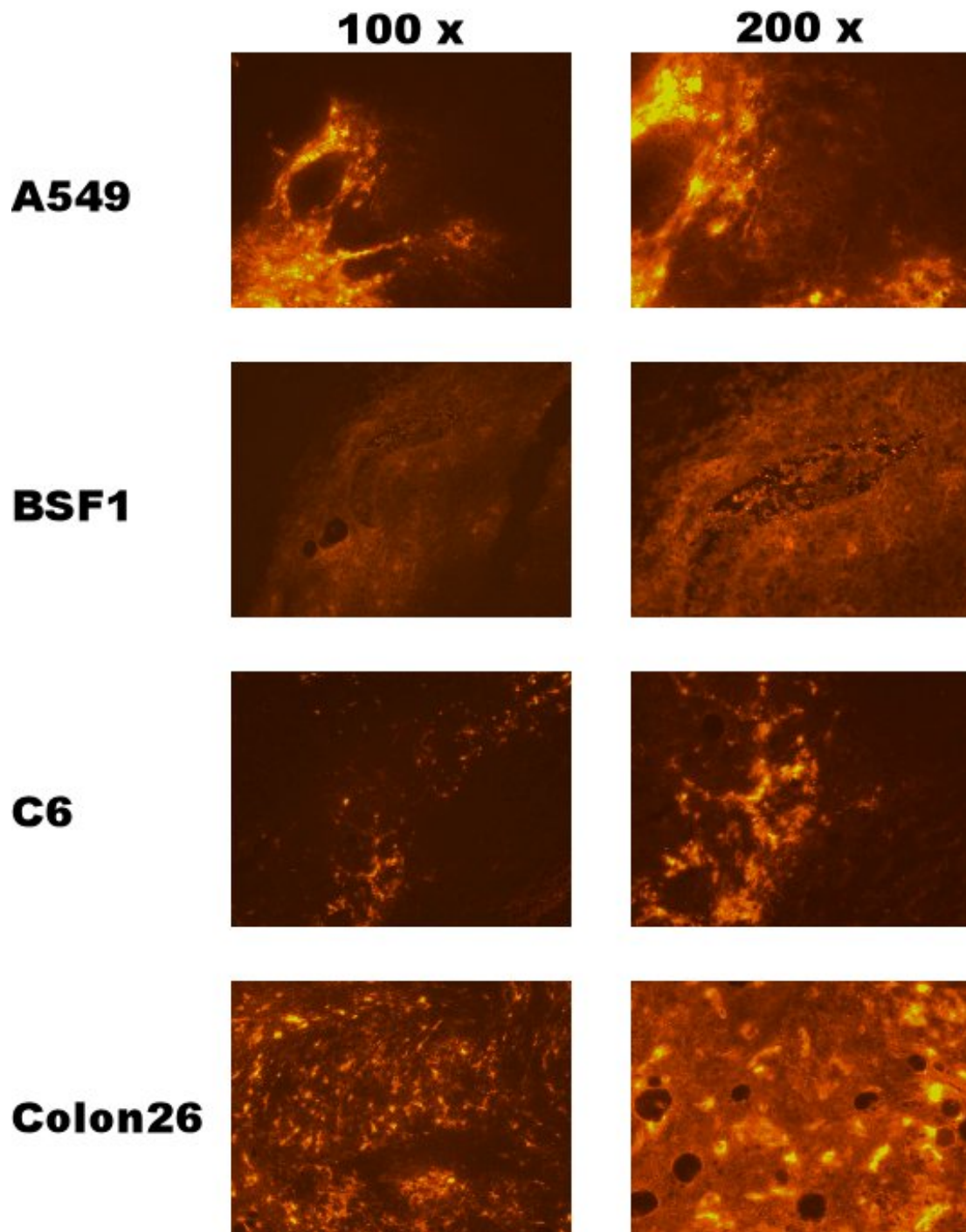


Abb. 2.34. Tumorakkumulation von Rhodamin-markierten AVE9

Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten verschiedener Tumore bei 100-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungsdauer.

Tumorzelllinien: A549: humanes Lungenkarzinom; BSF1: murines Fibrosarkom; C6: Rattenglioblastom; colon26: murines Kolonkarzinom

2.3. DISKUSSION UND AUSBLICK

Untersuchung und Optimierung liposomaler Hüllen als Träger von Inhaltsstoffen für eine spätere Antitumorthherapie

2.3.1. DISKUSSION DER *IN VITRO* UND *IN VIVO* ERGEBNISSE

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen auf der Basis der patentierten und bereits *in vitro* charakterisierten AVE-Formulierung (Müller *et al.*, 2001; Chander und Schreier, 1992; Nahde *et al.*, 2001) für eine spätere Antitumorthherapie hinsichtlich ihrer Halbwertszeit sowie ihrer Organverteilung optimiert, da verpackte Inhaltsstoffe nach einer intravenösen Applikation das pharmakokinetische Verhalten ihres liposomalen Trägers annehmen.

Aus diesem Grunde wurden die maßgeblichen Faktoren, welche die Pharmakokinetik und Organverteilung der untersuchten - und noch leeren - Liposomen beeinflussen, wie Größe, Zetapotential, Bindungsvermögen an Komplementfaktoren und andere Plasmaproteine sowie an Tumorzellen untersucht und die Formulierungen durch Austausch und Variation der Lipidanteile weiter optimiert.

Alle untersuchten Liposomenformulierungen zeigten Größen im Bereich von 70 nm bis etwa 100 nm (s. Abschnitt 2.2.2.1.). Der deutlich erkennbare Trend bei AVE9 mit steigendem Cholesterol-Gehalt an Größe zuzunehmen (s. Abb. 2.2.) kann auf die Eigenschaft des Cholesterols, die Lipidpackungsdichte in der Membran und die Stabilität der Membran durch Verringerung der Fluidität zu erhöhen, zurückzuführen sein. Dieser Effekt ist insbesondere im Hinblick auf spätere Ergebnisse in Tumorregressionsversuchen von Bedeutung und soll dort erneut aufgegriffen und diskutiert werden (s. hierzu Abschnitt 3.2.4.2.).

Die kryoelektronischen mikroskopischen Bilder zeigen für alle untersuchten Formulierungen eine homogene Struktur intakter Phospholipidvesikel von

nicht größer als 300 nm mit einem wässrigen Inneren. Ein Hängenbleiben der Liposomen im Kapillarnetz, wie es insbesondere für Teilchen ab 5 µm beobachtet werden kann, ist daher unwahrscheinlich (Poste *et al.*, 1982).

Die Ausgangsformulierungen AVE3 und AVE7 zeigten durch ihren Gehalt an PS noch jeweils stark negative Zetapotentiale von etwa -60 mV, ebenso wie die AVE5, bei denen durch den Austausch von PS gegen PG die negative Ladung erhalten blieb (etwa -40 mV) sowie AVE7 (s. Abschnitt 2.2.2.2.). Erst durch den Austausch des PS gegen PC wurde das Zetapotential deutlich weniger negativ mit etwa -10 mV für AVE14 und AVE9 (s. Abb. 2.3.). Insbesondere zeigten auch alle Formulierungen der AVE9 mit variierenden Cholesterolgehalten sehr niedrige Zetapotentiale, die sich nicht unterschieden.

Sehr auffällig ist die deutlich reduzierte Lagerstabilität von AVE13, einer auf der AVE3-Zusammensetzung basierenden Formulierung, bei der DOPS gegen synthetisches DPPC ausgetauscht wurde im Vergleich zu AVE14, bei denen DOPS gegen natürliches aus Ei isoliertes PC ausgetauscht wurde (s. Abschnitt 2.2.2.5. und Abb. 2.6. sowie Tab. 8.1.). Verantwortlich für die beobachtete Größenzunahme auf über 5000 nm ist vermutlich eine Aggregation der Liposomen und Fusion der Vesikel, welche bei dem Gemisch aus PC mit unterschiedlichen Fettsäureketten infolge einer optimaleren Membranpackungsdichte nicht auftritt. Zudem ist das aus Ei isolierte natürliche PC nur zu 98 % rein und kann andere stabilisierende Bestandteile wie SM (vgl. hierzu später AVE9) enthalten, die eine Fusion der einzelnen Vesikel verhindern.

Obgleich eine Fusion der einzelnen Liposomenvesikel für Zetapotentiale von mehr als -30 mV infolge der geringeren elektrostatischen Abstoßung wahrscheinlicher ist (persönliche Mitteilung Prof. Fahr; Universität Jena), tritt diese insbesondere bei den AVE9 (Zetapotential um -10 mV) nicht auf - vermutlich infolge der durch SM- und Chol-bedingten hohen Membranrigidität (s. hierzu auch die Ausführungen weiter unten).

Im *in vitro* Modell zur Bindung an Tumorzellen zeigten alle untersuchten Liposomen eine deutliche Bindung an A549-, MSM-, MeWo- und C6-Zellen, die Bindung von AVE3 und AVE9 an B254-Zellen war schwächer (s. Abschnitt 2.2.3.1. und Abb. 2.7.). Insbesondere unterschieden sich AVE3 und AVE9 sowie AVE3 und AVE14 sowie AVE7 und AVE9 in ihrem Bindungsverhalten an MeWo-Zellen. Alle Liposomen mit einem negativen Lipid in der Membran (AVE3 und AVE7) zeigten eine stärkere Bindung als die entsprechenden Formulierungen mit PC statt PS (AVE14 und AVE9). Da der beobachtete Effekt bei allen untersuchten Zellen ohne Ausnahme und unabhängig von der untersuchten Formulierung auftrat, ist hier eine PS-spezifische Wechselwirkung der Liposomenmembran mit der Zelle wahrscheinlich, möglicherweise indirekt durch eine Bindung der PS-haltigen Liposomen mit Proteinbestandteilen im Serum.

Vor dem Hintergrund der hohen Plasmaproteinaffinität der AVE3 und AVE5 (s. Abb. 2.11. und Abb. 2.12.) sowie der Komplement-aktivierenden Eigenschaften der AVE3 (s. Abb. 2.8.) wird deutlich, warum diese starke Bindung *in vitro* nicht mit einer analogen starken Affinität für Tumorzellen *in vivo* einhergeht, da die Bindung der Plasmaproteine -und hier speziell der nachgewiesenen Komplement- und Apolipoproteine- die Liposomenmembran destabilisiert und deren Plasmaverweildauern deutlich verkürzt (s. Abschnitt 2.2.4.1.1. und Abb. 2.13. sowie Allen, 1981; Wetterau und Jonas, 1983). Insbesondere die Komplement-induzierte Destabilisation von AVE3 wurde schon vorher durch Trübungsassays vermutet, jedoch nicht eindeutig nachgewiesen (Müller, 2000). Weder die AVE3 noch die AVE5 zeigten eine deutliche Tumorakkumulation (s. Abb. 2.15. und Abb. 2.33.). Hingegen ist die Aufnahme der AVE3 in der Leber mit über 80 % stärker als in allen anderen untersuchten Liposomen. Zwar zeigen auch die AVE5 keine Tumorakkumulation, doch ist ihre Leberaufnahme mit etwa 40 % deutlich schwächer als für AVE3 - bei etwa gleicher Akkumulation in der Milz - ein deutliches Indiz für einen PS-spezifischen Rezeptor in der Leber, der insbesondere PS-haltige Liposomen wie AVE3, AVE6 und AVE7 erkennt, um

diese schnell aus dem Blut zu eliminieren. So haben AVE3 und AVE7 die kürzesten aller ermittelten Plasmaverweilzeiten und hohe Leberakkumulationen von bis zu 80 %. Weder eine Pegylierung von AVE3 noch eine versuchte Absättigung der Zellen des retikuloendothelialen Systems mittels einer Decoy-Strategie vermochten deren Plasmaverweilzeiten deutlich zu verlängern, wenngleich bei der Pegylierung eine Verlagerung von der Leberakkumulation hin zu einer Akkumulation in den Zellen der Milz zu beobachten war. Die Existenz eines PEG-spezifischen Rezeptors wurde nicht untersucht, zumal für hohe Pegylierungsgrade der Effekt unterblieb. Auch eine erhöhte Tumorakkumulation konnte hierdurch nicht erreicht werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen eines für die Liposomenverweildauer negativen Einflusses des PS und einer negativen Ladung wurde im folgenden PS gegen PC ausgetauscht (AVE14 und AVE9). Die Ergebnisse waren mit einer mehr als 10-fachen Vergrößerung der AUC der AVE14 gegenüber AVE3 auf über 10000 %min. und einer etwa 2-fachen Verringerung ihrer Leberakkumulation deutlich. Für AVE9 war das Ergebnis sogar noch deutlicher: mehr als 15-fache Vergrößerung der AUC gegenüber AVE7 auf über 17000 %min. und eine mehr als 6-fache Verringerung der Leberakkumulation auf weniger als 15 %. Für beide Liposomenarten konnte eine sehr deutliche Tumorakkumulation nachgewiesen werden (s. Abb. 2.15. und Abb. 2.33.). Der Unterschied in der Verweildauer für AVE9 und AVE14 lässt sich durch die Kombination aus Cholesterol und Sphingomyelin begründen, die derart nur in AVE9 gegeben ist und die aufgrund intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen eine dichte Membranpackung der Lipide ermöglicht und daher infolge einer verminderten Fluidität die Einlagerung von Plasmaproteinen erschwert (Schmidt *et al.*, 1977; Sankaram und Thompson, 1990).

Da AVE9 eine starke Akkumulation in allen untersuchten Tumorarten aufwies (s. Abb. 2.34.), wurden die AVE9 des weiteren dahingehend

untersucht, inwieweit eine weitere Optimierung ihrer Lipidzusammensetzung in Hinblick auf eine spätere Verpackung von Chemotherapeutika möglich ist und welche Lipidfaktoren für die Eigenschaften dieser Liposomen essentiell sind.

Insbesondere führte der erneute Einbau einer geringen Menge PS in die AVE9 (AVE11 mit etwa 3 % PS) wie erwartet zu einer drastischen Reduktion der Blutverweildauer, einem Anstieg der Leberakkumulation und einem Verlust der Tumorakkumulation (s. Abb. 2.18., Abb. 2.19. und Abb. 2.20.). Die Variation des Cholesterol-Gehaltes führte lediglich im Bereich niedriger Gehalte von 10 % und 20 % zu einer Erniedrigung der Halbwertszeit: ein Ergebnis, welches hinsichtlich des Bestrebens, die Lipidmembran für die Verpackung eines Inhaltsstoffes möglichst dicht zu gestalten, positiv zu beurteilen ist und im Einklang mit späteren Ergebnissen steht (s. Abschnitt 3.2.4.2.). Zudem war es möglich, die Fettsäureketten der verwendeten Lipide auszutauschen und natürliches SM gegen synthetisches SM mit einer definierten Fettsäurekette zu ersetzen, ohne eine Einbuße in der Plasmahalbwertszeit oder der Tumorakkumulation akzeptieren zu müssen. Auch PE konnte ohne nachteilige Wirkungen gegen PC ausgetauscht werden (s. Abb. 2.27., Abb. 2.28. und Abb. 2.29.).

Hingegen war das SM in den AVE9 von essentieller Bedeutung für die sehr lange Plasmaverweildauer (s. Abb. 2.30.), wenngleich dennoch - möglicherweise infolge der immer noch sehr langen Halbwertszeitzeit und einer verbesserten Aufnahme - eine deutliche Tumorakkumulation nachzuweisen war. Insbesondere durch eine Pegylierung konnten die AVE9 zwar in ihrer Plasmaverweildauer verbessert werden, jedoch wenngleich nicht in ihrer Tumorakkumulation. Auch das Fehlen des SM konnte durch eine Pegylierung hinsichtlich der Halbwertszeit ausgeglichen werden. Der essentielle Einfluß des SM in Kombination mit dem Effekt kurzer Halbwertszeiten bei niedrigen Cholesterol-Gehalten bestärkt auch hier die Vermutung membranstabilisierender intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Cholesterol- und Sphingomyelinmolekülen (Allen *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1977).

Die Vermutung einer abschirmenden Wirkung des SM wird durch die Tatsache belegt, dass insbesondere hohe SM-Konzentrationen, wie sie in AVE9 (mit 18 % SM) und AVE9 30% SM zu finden sind, zu einer niedrigeren Bioverfügbarkeit im Tumor durch eine verringerte Aufnahme führen (s. Abb. 2.32.).

Insbesondere zeigten die AVE9 ähnliche pharmakokinetische Parameter und Organverteilungen wie bereits in der medizinischen Anwendung erprobte Standard DPPC/Chol-PEG-Liposomen (s. Abb. 2.30., Tab. 2.7. und Abb. 2.31.).

2.3.2. AUSBLICK

In diesem Teil der Arbeit wurde ausgehend von AVE7, die sich infolge ihrer kurzen Halbwertszeit und ihres Unvermögens im Tumor zu akkumulieren, als nicht geeignet für eine Antitumorthérapie mit Zytostatika erwiesen, die Liposomenformulierung AVE9 entwickelt und hinsichtlich Halbwertszeit, Organverteilung und Tumor-Akkumulation optimiert. Die entwickelten AVE9 erfüllten zudem alle pharmazeutisch-medizinischen Anforderungen bezüglich ihrer Größe sowie ihrer Lagerstabilität. Eine weitere chemische und physikalische Stabilisierung wäre durch die Verwendung von Phospholipiden mit ungesättigten und kurzkettigen Fettsäuremolekülen möglich, da diese die pharmakokinetische Parameter der AVE9 nicht negativ beeinflussten (s. Abb. 2.27. und Tab. 2.6.). Auch der Einbau von Targetmolekülen wäre denkbar, um die Tumorspezifität der Liposomen weiter zu erhöhen (Storm und Crommelin, 1998), wenngleich dann eine deutliche Veränderung der Plasmahalbwertszeit infolge der erhöhten Immunogenität der Liposomen zu erwarten ist (Harasym *et al.*, 1998; Phillips und Emili, 1991).

Dennoch gelten die hier ermittelten Daten lediglich für die leeren Liposomen und mußten im Folgenden um die Aussagekraft ermittelter

Daten für verpackte Inhaltsstoffe erweitert werden. Unklar bleibt also bis zu diesem Punkt, inwieweit die untersuchten Lipidveränderungen Verpackungsvermögen und -stabilität beeinflussen. Zwar konnte durch eine Pegylierung die Verweildauer der AVE9 im Blut weiter verlängert werden (s. Abb. 2.30. und Tab. 2.7.) eine Steigerung der Tumorakkumulation konnte hierdurch jedoch nicht erreicht werden (s. Abb. 2.32). Insbesondere aufgrund der bereits eingangs erwähnten Nachteile einer solchen Pegylierung (geringeres Einschlussvermögen, Induktion eliminierender Plasmaproteine) (Drummond *et al.*, 1999, Dams *et al.*, 2000; Laverman *et al.*, 2001), unterblieb eine weitere Optimierung in die Richtung einer solchen sterischen Stabilisation.

Diese Überlegungen sowie die Untersuchungen, ob die AVE9 tatsächlich in einer Antitumorthherapie mit verpackten Chemotherapeutika ähnlich effizient sind wie während der Untersuchung ihrer leeren Hüllen sollten im nächsten Abschnitt angestellt werden.

3. Anwendung von AVE-basierten liposomalen Trägersystemen für den systemischen Transport von Doxorubizin für eine Antitumorthherapie

3.1. EINLEITUNG

Allgemeine Wirkungsweise und Nebenwirkungen der systemischen zytostatischen Therapie, spezielle Wirkungsweise und Nebenwirkungen von Doxorubizin als Vertreter der Anthrazykline, Liposomen als Trägersysteme von Chemotherapeutika

In der Bundesrepublik Deutschland können jährlich nur etwa 15.000 Patienten - dies entspricht nicht mehr als 7 % der erwarteten tumorbedingten Todesfälle - durch Zytostatika geheilt werden (Wilmanns *et al.*, 2000). Das Ziel einer kurativen zytostatischen Chemotherapie ist die Behandlung manifester oder metastasierender Tumore zur Heilung des Patienten. Eine über 80 %-ige Heilungschance besteht beim Chorionkarzinom, Burkitt-Lymphom sowie dem Morbus Hodgkin bei Kindern; eine immerhin über 50 %-ige Chance zur Heilung besteht bei Hodentumoren, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie akuten lymphatischen Leukämien bei Kindern (Sauer, 1998). Bei der palliativen zytostatischen Chemotherapie zur Verbesserung der Lebensqualität durch Linderung von Schmerzen und anderen tumorbedingten Symptomen läßt sich nur in Einzelfällen eine Vollremission erreichen: Eine 10-30 %-ige Heilungschance besteht bei akuten lymphatischen Leukämien im Erwachsenenalter, Ovarial- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen sowie Osteosarkomen. Ohne kurative Chance im metastasierenden Krankheitsstadium sind insbesondere Mamma-, Prostata-, Dickdarm- und Pankreaskarzinome sowie Melanome. Häufig chemotherapieresistent sind Gallenblasen- und Leberzellkarzinome (Sauer, 1996).

Zytostatika wirken in spezifischer Weise an definierten Stellen des Zellteilungszyklus und können 5 unterschiedlichen Gruppen zugeordnet

werden (Sauer, 1998): den Antibiotika - insbesondere Anthrazykline wie z.B. Daunorubicin, Doxorubicin und Mitomycin (Galettis *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995; Bielack *et al.*, 1996; Gabizon und Martin, 1997; Cummings *et al.*, 1995) -, den Antimetaboliten - wie z.B. Fluoruracil oder Methotrexat (Gamelin *et al.*, 1997; Kamm *et al.*, 1998; Lennard, 1999) -, den Alkylantien - wie z.B. Melphalan oder Cyclophosphamid (Wu *et al.*, 1997; Fleming, 1997) -, den Vincaalkaloiden - wie z.B. Vinblastin und Vincristin (Joel, 1995; Vantellingen *et al.*, 1993) - sowie anderen Substanzen - wie z.B. Topotecan, Etoposid oder Mitoxantron (Von Pavel, 1997; Schacter, 1996; Simon *et al.*, 1997; Faulds *et al.*, 1991).

Zytostatische Antibiotika interkalieren in die DNA oder blockieren ihre Reparaturmechanismen und vereiteln derart eine fehlerfreie Verdopplung durch die DNA-Polymerase. Spezifischer Wirkungsmechanismus der Antimetaboliten ist die Hemmung von Schlüsselenzymen des Zellzyklus (Han *et al.*, 2003). Die Alkylierung der DNA-Stränge führt zur kovalenten Brückenbindung zweier Guanine und verhindert die Replikation, in deren Verlauf die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden müssen. Während die Vincaalkaloide die Ausbildung des Spindelapparates und derart die Trennung der Chromosomensätze verhindern, können zudem z.B. die Taxane die für die Synthese und Reparatur der DNA essentielle Aktivität der Topoisomerasen I und II blockieren (Wilmans *et al.*, 2000).

Da viele Zytostatika also nur auf proliferierende Zellen wirken und Tumore zudem aus einem unterschiedlich großen Anteil aus ruhenden Zellen bestehen, bedarf es für das Gelingen einer Therapie eines genauen Timings, bis jede Tumorzelle mindestens einmal den Zellzyklus durchlaufen hat. Im Verlaufe der Therapie kann es insbesondere bei den sich schnell reproduzierenden Geweben der Fortpflanzungsorgane zu mutagenen Schädigungen kommen. Neben der Induktion von Zweittumoren und akuten Leukämien sind toxische Nebenwirkungen wie Knochenmarkdepression, Immunsuppression, Übelkeit und Erbrechen sowie

Haarausfall bei fast allen Zytostatika nicht selten (Seegenschmiedt *et al.*, 1998).

Insbesondere die Vincaalkaloide und Anthrazykline wie Doxorubizin führen bei versehentlicher paravenöser Anwendung zu schweren lokalen Nekrosen mit der Folge der Exsision und Hauttransplantation (Wilmans *et al.*, 2000).

1940 konnte von Waksman und Woodruff das erste zytostatisch wirksame Antibiotikum aus einer Streptomyzetenkultur isoliert werden. 1957 wurde dann aus dem Stamm *Streptomyces peuceticus*, der in bakterienarmen Böden bei Andria in Ostitalien - der Heimat der Familie der Dauniner - vorkommt, ein rotes Pigment mit antitumoraler Wirkung gewonnen, welches entsprechend Daunomycin genannt wurde. In Anlehnung an die Herkunft des Urbodens und die rötliche Farbe wurde das später aus der Mutation *Streptomyces peuceticus variatio caesius* isolierte 14-hydroxy-Daunomycin Adriamycin oder Doxorubizin genannt. Der Entdeckung der Anthrazykline folgten weitere Antibiotika mit zytostatischer Wirkung wie Bleomycin und Mitomycin (Waksman Conference 1974; Weiss *et al.*, 1986).

Für die Anthrazykline wie Daunorubicin und Doxorubizin wurden zahlreiche zytostatische Wirkungsmechanismen beschrieben (s. Tab. 3.1.): So führt die Interkalation in die DNA zur Inhibition von Replikation und Transkription (Patel und Canuel, 1978; Phillips *et al.*, 1988), erstere wird zudem durch die Inhibition der Topoisomerase II (Mutschler, 1996), letztere insbesondere auch durch die Komplexbildung der RNA blockiert (Phillips *et al.*, 1978). Die intermediär auftretenden Semichinonradikale reagieren mit Sauerstoff und generieren Superoxide, Wasserstoffperoxide und Hydroxylradikale, die zur Schädigung von Enzymen, Membranen und der DNA führen (Bachur *et al.*, 1977; Handa und Sato, 1975; Powis, 1987).

1. DNA-Interkalation

- Hemmung der DNA-Replikation
- Hemmung der Transkription

2. Bildung freier Radikale

- Bildung von Anthrazyklin-Semichinonen
- Bildung von Peroxid-, Superoxid- und Hydroxylradikalen
- Reaktion mit Makromolekülen (Lipidperoxidation, DNA-Einzelstrangspaltung)

3. Direkte Zellmembraneffekte

- Bindung an Phospholipide der Zell- und Mitochondrienmembran

4. Interferenz mit dem Energiestoffwechsel

- Hemmung des Koenzyms Q10
- Hemmung der Natrium-/Kalium-abhängigen ATPase (Gosalvez *et al.*, 1979)

Tab. 3.1. Wirkungen der Antracyclin-Antibiotika (modifiziert nach Wilms, 1981)

Zusätzliche Membraneffekte wie die Hemmung der kardialen mitochondrialen Kalziumpumpe (Moore *et al.*, 1977; Boucek *et al.*, 1987; Keyes *et al.*, 1987) oder des Koenzyms Q₁₀ der Atmungskette (Cortes *et al.*, 1978) sind jedoch zusätzlich auch für die Nebenwirkungen wie die häufig beobachtete Kardiomyopathie, also die Zerstörung der sich nicht mehr teilenden Zellen des Myokards, verantwortlich (s. Tab. 3.2.). Weitere chronische Nebenwirkungen sind die schon erwähnte Knochenmarkdepression, Immunsuppression, Alopezie sowie teratogene und mutagene Wirkungen auf gesunde Gewebe. Zu den akuten Nebenwirkungen gehören Übelkeit und Erbrechen, Fieber, akutes Nierenversagen sowie allergische Reaktionen.

Klinische Anwendung findet Doxorubizin bei der Therapie zahlreicher Tumore, darunter Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Leberkarzinome sowie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, akute lymphatische und myeloische Leukämien, Sarkome und Neuroblastome (Wilmanns *et al.*, 2000).

Akute Nebenwirkungen:

- Übelkeit, Erbrechen, Durchfall
- Fieber, Schüttelfrost
- Allergische Reaktionen, Nesselausschlag, Hautrötungen, Bläschenbildung
- Entzündungen der Venenwand
- Lokale Nekrosen bei paravenöser Injektion
- Appetitlosigkeit
- Akutes Nierenversagen

Chronische Nebenwirkungen:

- Knochenmarkdepression
- Alopezie
- Immunsuppression
- Pigmentstörungen
- Teratogene und mutagene Effekte
- Kardiotoxizität

Tab. 3.2. Nebenwirkungen von Doxorubizin (modifiziert nach Wilms, 1981)

Doxorubizin wird in einer triphasischen Kinetik aus dem Blut eliminiert, wobei die Halbwertszeit der initialen Phase 12 min. beträgt, die der intermediären Phase 3,3 h und die der Spätphase etwa 30 h (Benjamin *et al.*, 1977). Die rasche Metabolisierung erfolgt in der Leber mit einer anschließenden biliären Ausscheidung von bis zu 60 % der initialen Dosis (Creasey *et al.*, 1976). Die zwei Hauptwege der Metabolisierung bestehen zum einen in der Reduktion zum Alkohol Adriamycinol (Doxorubizinol) - einem aktiven DNA-bindenden Metaboliten - und zum anderen in der reduktiven Abspaltung des Aminosuckers zum inaktiven Aglykon-Metaboliten (Seeber, 1981).

Die rasche Elimination aus dem Blut mit anschließender hepatischer Metabolisierung bedingt eine wiederholte Therapie, die jedoch infolge der ernstesten Nebenwirkungen auf eine lebenslang geltende kumulative Höchstdosis von etwa 550 mg/m² begrenzt ist. Um insbesondere die toxischen Blutkonzentrationsspitzen nach intravenöser Gabe zu vermeiden, kann eine kontinuierliche i.v. Infusion mit einer kumulativen Höchstdosis von 800 mg/m² angewendet werden (Wilmans *et al.*, 2000).

Liposomen als Wirkstoffträger von Anthrazyklinen und anderen Zytostatika können deren therapeutischen Index erhöhen, indem sie die Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verringerung der Nebenwirkungen steigern (Gabizon *et al.*, 1998). Durch die liposomale Verpackung werden zum einen die Zytostatika vor der frühzeitigen Metabolisierung geschützt, zum anderen werden auch die gesunden Gewebe, insbesondere die Zellen des Blutes sowie das Gewebe an der Injektionsstelle, vor den nekrotisierenden toxischen Effekten bewahrt (Crommelin *et al.*, 2002). Da die pharmakokinetischen Parameter sowie die Organverteilung nicht mehr durch den Inhaltsstoff selbst, sondern durch den liposomalen Träger vorgegeben werden, können toxische Blutkonzentrationsspitzen vermieden werden, da die Liposomen während ihrer Zirkulationszeit den Wirkstoff nur langsam abgeben (Barrat, 2000).

Wirksame Formulierungen liposomaler Anthrazykline setzen also lang zirkulierende Liposomen mit nur langsamer Freisetzung des Inhaltsstoffs voraus (Gabizon *et al.*, 1994). Insbesondere die bereits in der Einleitung zu Kapitel 2 beschriebenen Effekte wie die Opsonisierung der Liposomen durch Plasmaproteine mit anschließender Destabilisierung der Lipidmembran und Elimination in Leber und Milz unterminieren die Wirksamkeit liposomaler Formulierungen von Zytostatika infolge einer frühzeitigen Freisetzung des Wirkstoffs aus den Liposomen.

Die spezifische Akkumulation des liposomalen Zytostatikums im Tumor unter Vermeidung sensibler Organe wie des Herzens kann durch passive oder aktive Zielsteuerung der Liposomen erfolgen (Mayer *et al.*, 1998). Insbesondere in entzündeten Geweben oder Bereichen einer bakteriellen Infektion kommt es durch von infiltrierten Granulozyten abgegebene Zytokine zu Schädigungen des Endothels mit der Folge einer erhöhten vaskulären Permeabilität (Chen *et al.*, 1996). In den hypoxischen Bereichen schneller Zellproliferation maligner Gewebe kommt es infolge der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF zur Neovaskularisierung mit der Ausbildung eines fenestrierten Endothels (Hanahan *et al.*, 1996; Rak *et al.*, 1996; Dvorak *et al.*, 1995). In diesen Bereichen können Liposomen von

etwa 100 nm Größe das Blutgefäßsystem in das Interstitium verlassen (Wu *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1994) und im Tumor infolge fehlender Lymphdrainage akkumulieren (*Passive Zielsteuerung*) (Maeda *et al.*, 1992; Baxter und Jain, 1991), so dass bis zu 15 fach höhere Konzentrationen als bei Infusion des freien Wirkstoffes erreicht werden können (Mayer *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1995; Parr *et al.*, 1997).

Durch die Kopplung von tumorendothel- oder tumorspezifischen Liganden wie VEGF (Backer *et al.*, 2002) oder Transferrin (s. hierzu auch Kap. 4) (Keer *et al.*, 1990; Thorstensen und Romslo, 1993) soll die Akkumulation im Tumor sowie die Aufnahme der Liposomen in die Tumorzellen weiter erhöht werden (*aktive Zielsteuerung*) (Gabizon, 2002).

Nach Eintreten in das Tumorgewebe destabilisieren die Liposomen vermutlich infolge des leicht sauren pH sowie vorhandener Lipasen und oxidativer Substanzen im Tumorinterstitium und geben ihren Inhaltsstoff frei (Uster *et al.*, 1998; Storm *et al.*, 1988). Nur ein geringer Teil wird von tumorassoziierten Makrophagen aufgenommen und prozessiert, die dann den Inhaltsstoff wieder freigeben (Mayer *et al.*, 1997; Storm *et al.*, 1988; Harasym *et al.*, 1997). Im Falle einer aktiven Zielsteuerung werden die Liposomen zudem via Rezeptor-vermittelter Endozytose von den Tumorzellen aufgenommen (Lee und Low, 1994; Suzuki *et al.*, 1995; Park, 2002).

Liposomale Chemotherapeutika müssen für eine wirksame zytostatische Therapie also hinsichtlich ihrer Verweildauer im Blut optimiert werden, um effizient im Tumor zu akkumulieren. Während ihrer Zirkulation müssen sie den Inhaltsstoff stabil verpacken, um ein frühzeitiges Austreten (leakage) und toxische Blutkonzentrationsspitzen zu vermeiden (Gabizon, 1988). Insbesondere durch hohe Cholesterolkonzentrationen kann die Permeabilität der Liposomenmembran verringert werden (Papahadjopoulos *et al.*, 1972; Papahadjopoulos *et al.*, 1973a; Papahadjopoulos *et al.*, 1973b; Bally *et al.*, 1990). Durch den zusätzlichen Einbau von Sphingomyelin in die Liposomenmembran kommt es durch die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen mit Cholesterol zu einer weiteren Stabilisierung der Lipidmembran (Smaby *et*

al., 1996, Schmidt *et al.*, 1977). Weiterhin kann die frühzeitige Freisetzung des Inhaltsstoffs durch die Verwendung langkettiger und ungesättigter Fettsäuren in den verwendeten Phospholipiden verzögert werden (Mayer *et al.*, 1988; Bally *et al.*, 1990).

Eine hohe Stabilität limitiert jedoch die Bioverfügbarkeit des Zytostatikums im Tumor, wo eine Freisetzung in das Gewebe notwendig ist, wenn keine spezifische Aufnahme der Liposomen durch die Tumorzellen erfolgt. Die Entwicklung von liposomalen Zytostatika mit einem optimalen Gleichgewicht von Zirkulationsdauer und Freisetzungskinetik ist zudem insbesondere von dem verwendeten Inhaltsstoff abhängig (Mayer *et al.*, 1998), der in einer möglichst hohen Konzentration in den Liposomen vorliegen sollte. Dies kann durch die Verwendung spezieller Verpackungstechniken wie des *Remote Loading Verfahrens* erreicht werden, bei der mittels eines Ammoniumsulfatgradienten ein gelartiger Zustand des Doxorubizins im Innern der Liposomen erreicht wird (s. hierzu auch Abschnitt 6.7.4.5.) (Frezard, 1994).

Bis heute konnten zahlreiche Zytostatika liposomal verpackt werden und ihre höhere Wirksamkeit bei geringerer Toxizität gegenüber dem freien Zytostatikum *in vivo* nachgewiesen werden, darunter z.B. Melphalan (Kirby und Gregoriadis, 1983), Bleomycin (Arndt und Zeisig, 2001) sowie Mitoxantron (Lim *et al.*, 1999). Zahlreiche weitere Substanzen befinden sich in klinischen Studien, darunter z. B. Annamycin (Lian und Ho, 2001). Zur Behandlung maligner Erkrankungen befinden sich bereits DOXIL® und DaunoXome® auf dem Markt (weitere liposomale Formulierungen zur Behandlung anderer Erkrankungen s. Tab. 1.2. und das Internet unter <http://www.medscape.com>; Stand: 20.07.2003).

3.2. ERGEBNISSE

Biophysikalische, zellbiologische und physiologische in vitro und in vivo Charakterisierung

3.2.1. ÜBERBLICK

Vorgehensweise bei der Untersuchung liposomal verpackten Doxorubizins

Nach der Untersuchung und Optimierung der Plasmaverweildauer, Organverteilung und Tumorakkumulation verschiedener Liposomenformulierungen in Kapitel 2 konnten die AVE9¹ als langzirkulierende und im Tumor akkumulierende Liposomen entwickelt werden. Da die entsprechenden Experimente jedoch mit den leeren Liposomen als späteren Trägern von Chemotherapeutika durchgeführt wurden und daher zunächst nicht ohne weiteres auf das Verhalten beladener Liposomen übertragbar sind, wurden in diesem Kapitel entsprechende Untersuchungen hinsichtlich einer solchen Verwendbarkeit der Liposomen durchgeführt.

Für den erfolgreichen Einsatz von Liposomen in der chemotherapeutischen Tumorthherapie spielen insbesondere die Membranstabilität der Liposomen sowie deren Vermögen, den Inhaltsstoff nach Akkumulation im Tumor freizugeben, eine wichtige Rolle (s. hierzu Kap. 3.1.). Die folgenden Untersuchungen wurden mit Doxorubizin als dem am häufigsten in der chemotherapeutischen Tumorthherapie verwendeten Anthrazyklin mit dem breitesten Wirkungsspektrum (s. Tab. 3.1.) (Ehninger und Schuler, 1990) angestellt.

¹ im folgenden je nach Variation ihres Cholesterolgehaltes entweder als AVE9 35%Chol oder AVE9 50%Chol bezeichnet, nach Beladung mit Doxorubizin zudem als AVE9 35%Chol DOX oder AVE9 50%Chol DOX bezeichnet. AVE9 ohne weitere Erklärung haben einen Cholesterolanteil von 35 %.

Den biophysikalischen Untersuchungen der Liposomen hinsichtlich ihrer Größe vor und nach Beladung mit Doxorubizin mittels *Remote Loading* sowie ihrer Beladungseffizienz bei verschiedenen Lipid:Doxorubizin-Verhältnissen und der kryoelektronischenmikroskopischen Untersuchung der beladenen Liposomen folgt ihre zellbiologische *in vitro* Untersuchung hinsichtlich der Toxizität und Zellaufnahme verschiedener Formulierungen, insbesondere AVE3 und AVE9 mit verschiedenen Cholesterolgehalten im Vergleich zum freien Doxorubizin. Die anschließenden Untersuchungen der Stabilität verschiedener Liposomen nach Inkubation mit humanem Plasma erlauben erste Aussagen über die Stabilität der Liposomenmembran und ihr mögliches Verhalten in der Blutzirkulation und sind insbesondere im Kontext der folgenden *in vivo* Untersuchungen zu beurteilen, welche die Plasmaverweildauer und Organverteilung sowie die Tumorakkumulation freien und liposomalen Doxorubizins zeigen. Die gesonderte Betrachtung der Verteilung freien und liposomalen Doxorubizins im Herzen soll mögliche Nebenwirkungen (s. Tab. 3.2.) besser einschätzbar machen.

Das Kapitel schließt ab mit der systematischen Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Liposomenformulierungen im murinen Tumormodell, insbesondere der AVE9 mit einem hohen Cholesterolgehalt im Vergleich zu freiem Doxorubizin oder bereits für die chemotherapeutische Therapie eingesetztem DOXIL® sowie dem schon erwähnten membranstabilisierenden Effekt des Sphingomyelins (vgl. hierzu Abschnitt 2.2.4.1.7.).

3.2.2. BIOPHYSIKALISCHE IN VITRO CHARAKTERISIERUNG

Größe, Verpackungseffizienz und -stabilität sowie kryoelektronenmikroskopische Bilder der untersuchten Liposomenformulierungen

3.2.2.1. UNTERSUCHUNG DER EFFIZIENZ EINER BELADUNG MITTELS REMOTE LOADING

Beladungsdauer, Doxorubizin:Lipid-Verhältnis sowie Cholesterolgehalt

Die Liposomen wurden wie im Abschnitt 6.7.4.5. beschrieben von Frau Tanja Hilka bei der vectron therapeutics AG mittels dem *Remote Loading* Verfahren mit Doxorubizin beladen. Um eine möglichst maximale Beladungseffizienz von AVE9 35%Chol und AVE3 als Kontroll-Liposomen zu erreichen, wurden insbesondere die Dauer der Beladung sowie das Doxorubizin:Lipid-Gewichtsverhältnis der Liposomen untersucht und optimiert. Die Analyse der Beladung der Liposomen erfolgte wie im Abschnitt 6.7.4.11.1. beschrieben.

Beim *Remote Loading* Verfahren gelangt das Doxorubizin während einer Erwärmung des Ansatzes auf 60 °C dem pH-Gradienten folgend in das Innere der Liposomen. Der Einfluß der Dauer dieser Beladungsphase wurde unter Variation des Lipid:Doxorubizin-Verhältnisses untersucht.

Wie der Abbildung 3.1. zu entnehmen ist, wurden AVE9 35%Chol bereits innerhalb der ersten 5 Minuten maximal mit Doxorubizin beladen. Bei einem Doxorubizin:Lipid-Gewichtsverhältnis von 1:10 betrug der maximale Beladungsgrad 99 %, bei einem Doxorubizin:Lipid-Gewichtsverhältnis von 1:5 etwa 84 %. Zu beachten ist jedoch, dass die absolute Menge an in die Liposomen eingeschlossenem Doxorubizin beim Verhältnis von 1:5 etwa um den Faktor 2 höher ist und somit die Verpackung zwar ineffizienter erfolgt, jedoch den Transport einer höheren Doxorubizinmenge ermöglicht.

Die maximale Beladung erfolgte innerhalb der ersten 15 Minuten, um danach innerhalb von 60 Minuten rasch auf weniger als 80 % (1:10 Verhältnis) und weniger als 40 % (1:5 Verhältnis) abzusinken.

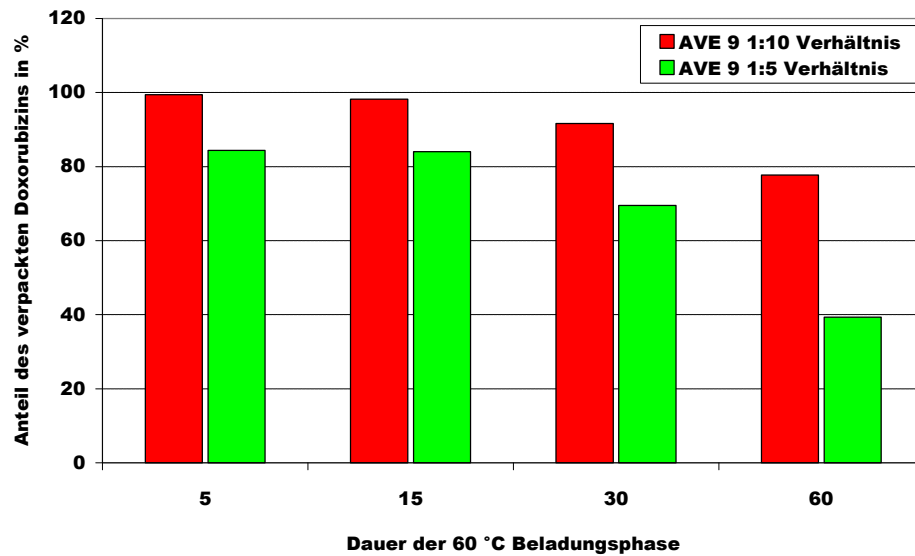


Abb. 3.1. Doxorubizin-Beladungsgrad von AVE9 35%Chol in Abhängigkeit von der Länge der Beladungsdauer beim Remote Loading Verfahren

Auch für die Kontroll-Liposomen AVE3 wurde, um die Vergleichbarkeit der nachfolgenden Versuche zu gewährleisten, das optimale Doxorubizin:Lipid-Verhältnis bestimmt.

In Abbildung 3.2. ist zu erkennen, dass sich bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:10 eine Beladung von etwa 70 % erreichen ließ, bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:5 hingegen nur eine Beladung von etwa 40 %.

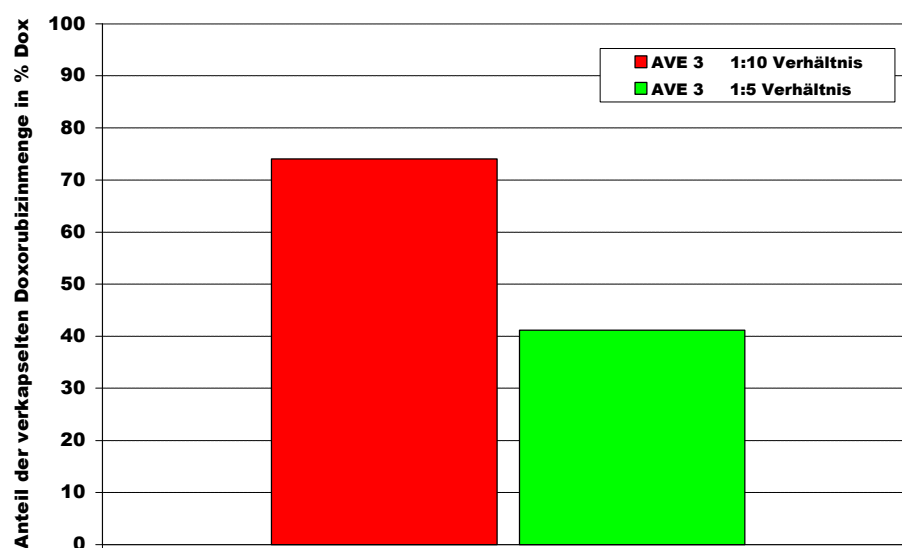


Abb. 3.2. Doxorubizin-Beladungsgrad von AVE3 in Abhängigkeit vom Doxorubizin:Lipid-Verhältnis beim Remote Loading Verfahren

Da der Cholesterolgehalt für die Stabilität der Lipidmembran von entscheidender Bedeutung ist (Bally *et al.*, 1990), jedoch bei der pharmakokinetischen Untersuchung der entsprechenden AVE9 mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt nur bei geringen Konzentrationen die Zirkulation im Blut verkürzte (s. Abschnitt 2.2.4.1.5.), wurde in diesem Abschnitt insbesondere der Einfluß des Cholesterolgehaltes in der Liposomenmembran auf die Beladungseffizienz untersucht. Der Beladungsgrad nach *Remote Loading* wurde für AVE9 30-50%Chol bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:10 und 1:5 bestimmt.

Bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:10 wurde die maximale Beladung mit etwa 90 % für AVE9 35%Chol beobachtet, höhere oder niedrigere Cholesterolanteile in der Lipidmembran führten zu 10-15 % niedrigeren Beladungseffizienzen. Bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:5 konnte hingegen keine tendenzielle Cholesterolabhängigkeit beobachtet werden, die Beladungseffizienz betrug um die 80 % (siehe Abbildung 3.3.).

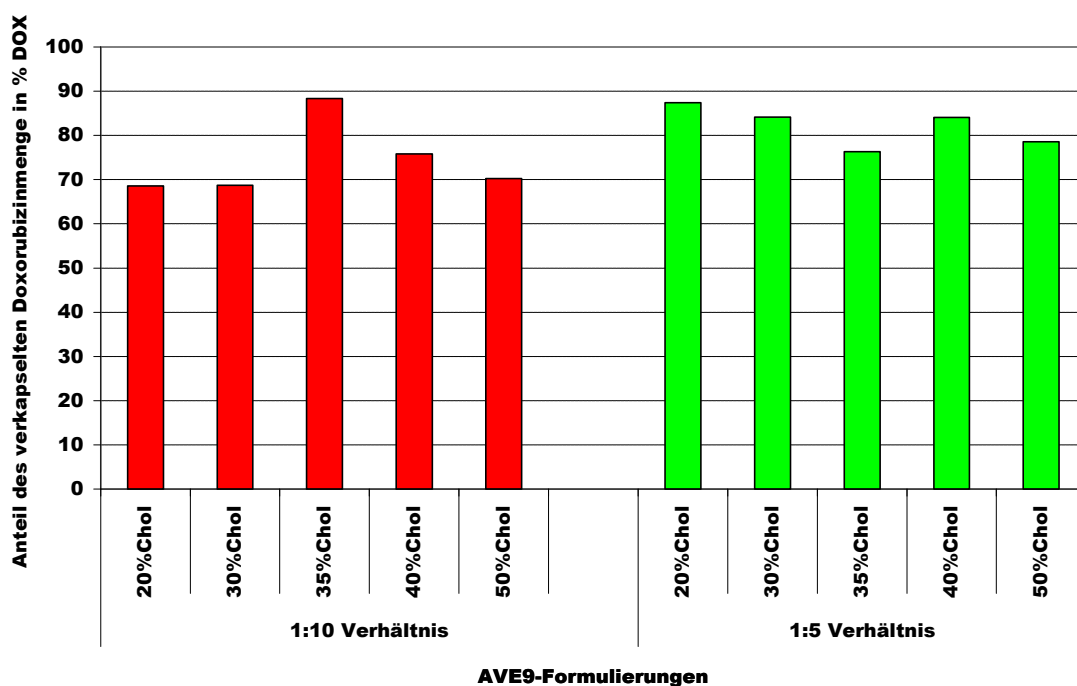


Abb. 3.3. Doxorubizin-Beladungsgrad von AVE9 in Abhängigkeit ihres Cholesterolanteils in der Lipidmembran beim *Remote Loading* Verfahren

3.2.2.2. GRÖßEN

Um den Einfluß der Beladung der Liposomen mit Doxorubizin auf ihre Größe zu untersuchen, wurde deren Größe vor und nach Beladung mittels PCS ermittelt (vgl. hierzu insbesondere Abschnitt 2.2.2.1.). Die Beladung der Liposomen erfolgte dazu bei einem Doxorubizin:Lipid-Verhältnis von 1:5. Alle Größenbestimmungen wurden an mindestens 3 verschiedenen Chargen durchgeführt.

Alle untersuchten Liposomen unterlagen infolge der Beladung mit Doxorubizin einem geringfügigen Wachstum von weniger als 10 nm, jedoch blieben alle untersuchten Liposomen unter einer Größe von 120 nm (s. Abbildung 3.4.).

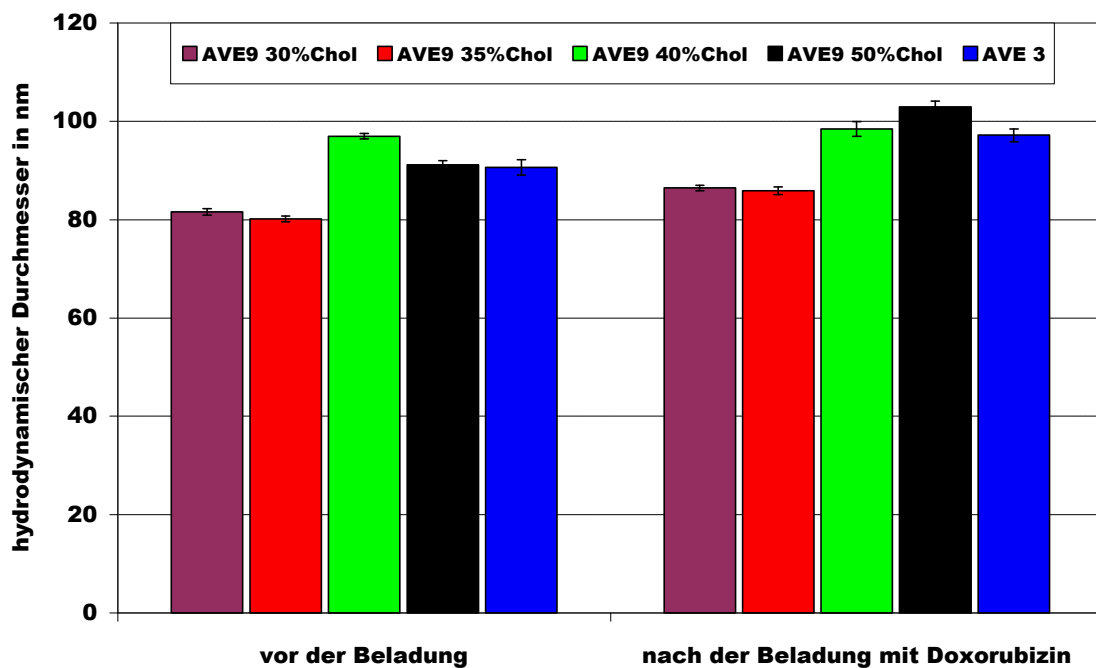


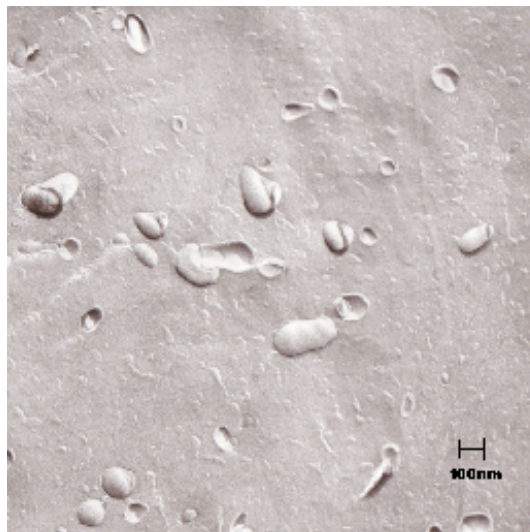
Abb. 3.4. Größe der Liposomen vor und nach Beladung mit Doxorubizin mittels des Remote Loading Verfahrens

3.2.2.3. KRYOELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

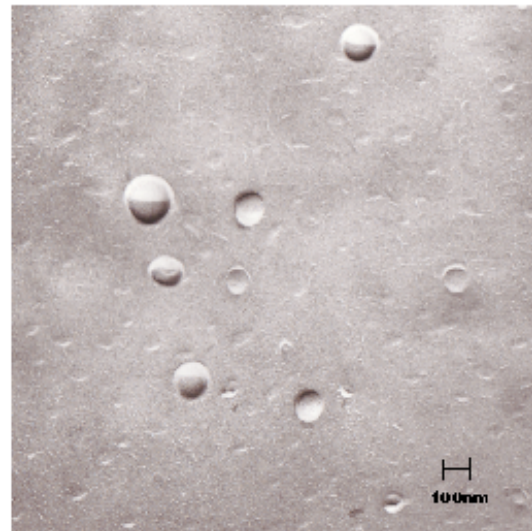
Der Einfluß der Beladung der Liposomen mit Doxorubizin auf ihre Morphologie und Integrität wurde mittels Gefrierbruchabbildungen und kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Liposomen untersucht. Dazu wurden die beladenen und unbeladenen Liposomen der jeweils selben Charge durch Herrn Andreas Graser von der vectron therapeutics AG in Marburg sowie Herrn Steiniger vom Zentrum für Elektronenmikroskopie in Jena untersucht.

Die leeren AVE9 50%Chol und beladenen AVE9 50%Chol DOX zeigten in den Gefrierbruchabbildungen eine überwiegend unilamellare Struktur bei Vesikelgrößen zwischen 70 und 130 nm (siehe Abbildung 3.5.). Ihre Form war jedoch recht unterschiedlich, da die leeren oft eiförmigen und ovalen AVE9 50%Chol nach Beladung nahezu kreisrund wurden. Größere Vesikel, wie sie insbesondere nach Vesikelfusion entstehen, traten in beiden Fällen nur zu einem sehr geringen Anteil von weniger als 0,5 % auf. Aussagen über den Anteil an eingeschlossenem oder freiem Doxorubizin konnten anhand der Bilder nicht getätigt werden.

Die Aussagen der Gefrierbruchabbildungen hinsichtlich Form und Größe der untersuchten Liposomen konnten durch die kryoelektronenmikroskopischen Bilder in Abb. 3.6. bestätigt werden. Zudem konnten im Inneren von etwa 50 % der sichtbaren AVE9 50%Chol DOX U-förmige, teils runde, teils scheibenförmige Strukturen mit feiner Längsausrichtung ausgemacht werden - vermutlich ausgefallene Doxorubizinkristalle.

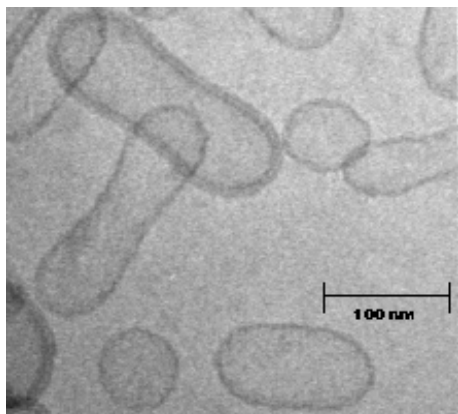


AVE9 50%Chol

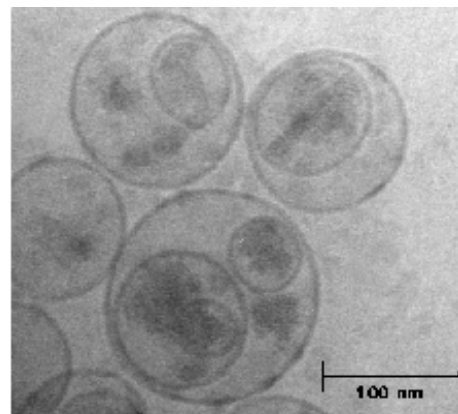


AVE9 50%Chol DOX

Abb. 3.5. Gefrierbruchpräparate von AVE9 50%Chol und AVE9 50%Chol DOX



AVE9 50%Chol



AVE9 50%Chol DOX

Abb. 3.6. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von AVE9 50%Chol und AVE9 50%Chol DOX

3.2.2.4. LAGERSTABILITÄTEN

Um die AVE9 DOX mit unterschiedlichen Cholesterolanteilen in der Membran hinsichtlich ihrer Größe und ihres Vermögens, das verpackte Doxorubizin nicht frühzeitig aus dem Innern freizusetzen, wurden diese nach ihrer Herstellung und Sterilfiltration im Kühlschrank bei 4°C bis 8°C gelagert. Zur Überprüfung der Stabilität wurden zu vorher festgelegten Zeitpunkten Proben der Chargen entnommen, die von Frau Tanja Hilka bei der vectron therapeutics AG mittels PCS hinsichtlich der Partikelgröße sowie mittels HPLC hinsichtlich des Anteils an verpacktem Doxorubizin analysiert wurden (s. Abschnitt 6.7.4.7. und 6.7.4.11.1.).

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Monaten zeigten die AVE9 50%Chol DOX das geringste Wachstum von weniger als 10 nm. Alle übrigen untersuchten Liposomen zeigten ein Wachstum von weniger als 20 nm (siehe Abbildung 3.7.).

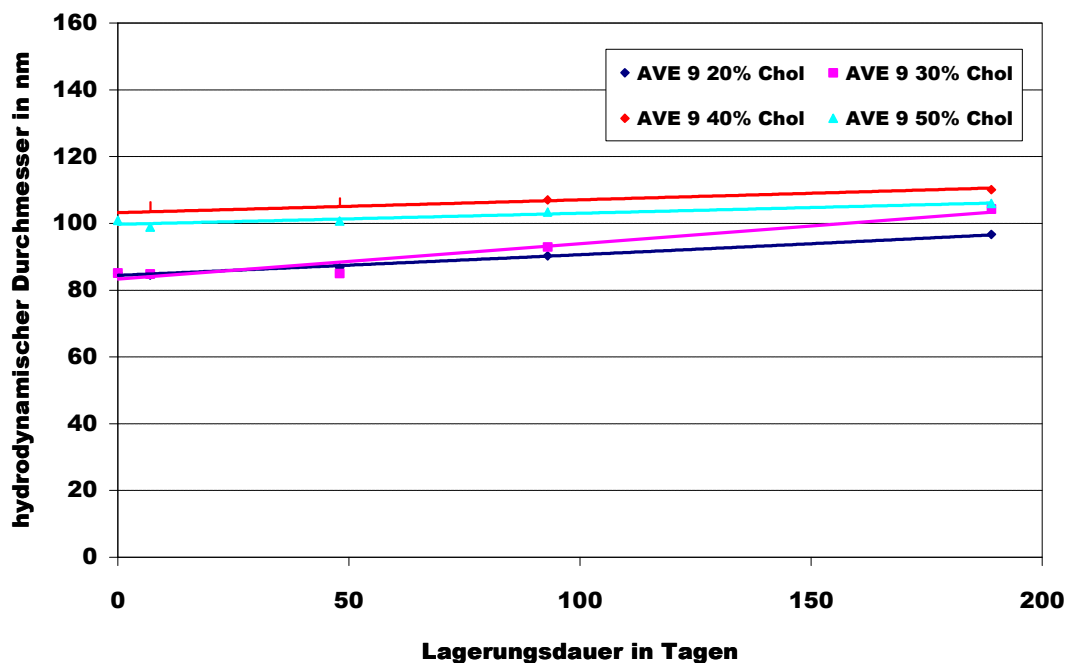


Abb. 3.7. Lagerstabilität der untersuchten Liposomenpräparationen

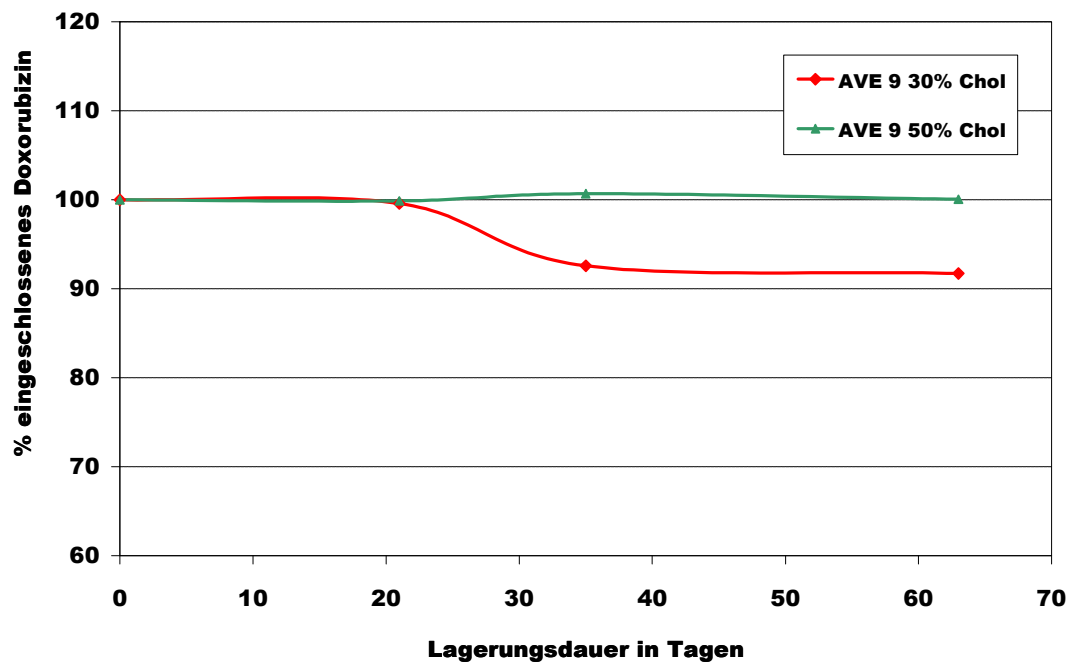


Abb. 3.8. Untersuchung des Anteils verpackten Doxorubizins in AVE9 30%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX während einer Lagerung bei 4°C.

Der Abbildung 3.8. ist zu entnehmen, dass sowohl AVE9 30%Chol DOX als auch AVE9 50%Chol DOX den Inhaltsstoff über einen Zeitraum von 20 Tagen stabil in ihrem Inneren inkorporieren. Am Tag 35 nach Beginn der Messung haben AVE9 30%Chol DOX bereits 10 % freigesetzt, dieser Wert bleibt stabil bis zum Ende der Messung an Tag 65. Über den gesamten Zeitraum der Messung haben die AVE9 50%Chol DOX hingegen kein verpacktes Doxorubizin messbar freigesetzt.

3.2.3. ZELLBIOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE *IN VITRO* CHARAKTERISIERUNG

Aufnahme, Toxizität und Stabilität nach Plasmainkubation

3.2.3.1. AUFNAHMESTUDIEN

Um die Aufnahme freien Doxorubizins im Vergleich zu verschiedenen Formulierungen von liposomal verpacktem Doxorubizin zu untersuchen, wurden Aufnahmestudien an verschiedenen Zellen unternommen, wobei die kräftige Eigenfluoreszenz des Doxorubizins ausgenutzt wurde (s. Abschnitt 6.7.2.8. und 6.7.2.9.). Hierzu wurden sowohl im FACS als auch im Mikroskop insbesondere AVE3 und AVE9 35%Chol sowie AVE9 50%Chol mit freiem Doxorubizin verglichen.

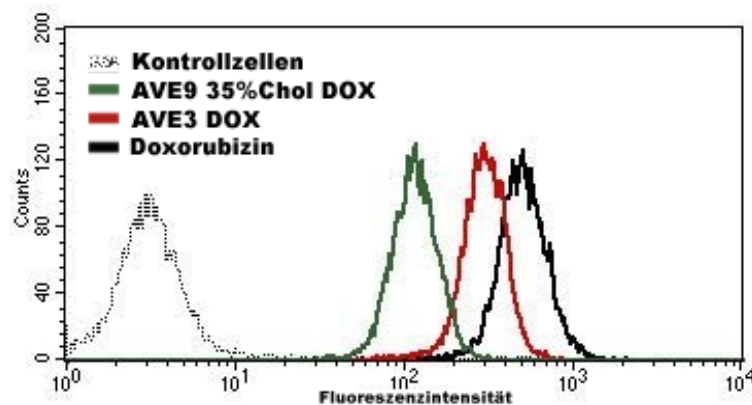


Abb. 3.9. FACS-Aufnahmestudien an humanen Melanomzellen (MeWo)

Die Zellen wurden für 30 min. mit den entsprechenden Formulierungen inkubiert.

Die Abbildung 3.9. zeigt, dass die Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation mit freiem Doxorubizin am stärksten fluoreszierten. Weniger stark, aber deutlich stärker als nach Inkubation mit AVE9 35%Chol DOX, fluoreszierten die Zellen nach der Inkubation mit AVE3 DOX.

Die Abb. 3.10. veranschaulicht die unterschiedlich starke Aufnahme von AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX in humane Melanom- und Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu freiem Doxorubizin nach einer einstündigen Inkubation. Auch hier ergab sich wie bereits zuvor in der FACS-

Untersuchung, dass freies Doxorubizin zu einer deutlich stärkeren Fluoreszenz der Zellkerne führt als das liposomale Doxorubizin egal welcher Formulierung. Die AVE3 DOX führten auch hier zu einer stärkeren Fluoreszenz als die AVE9 35% Chol DOX.

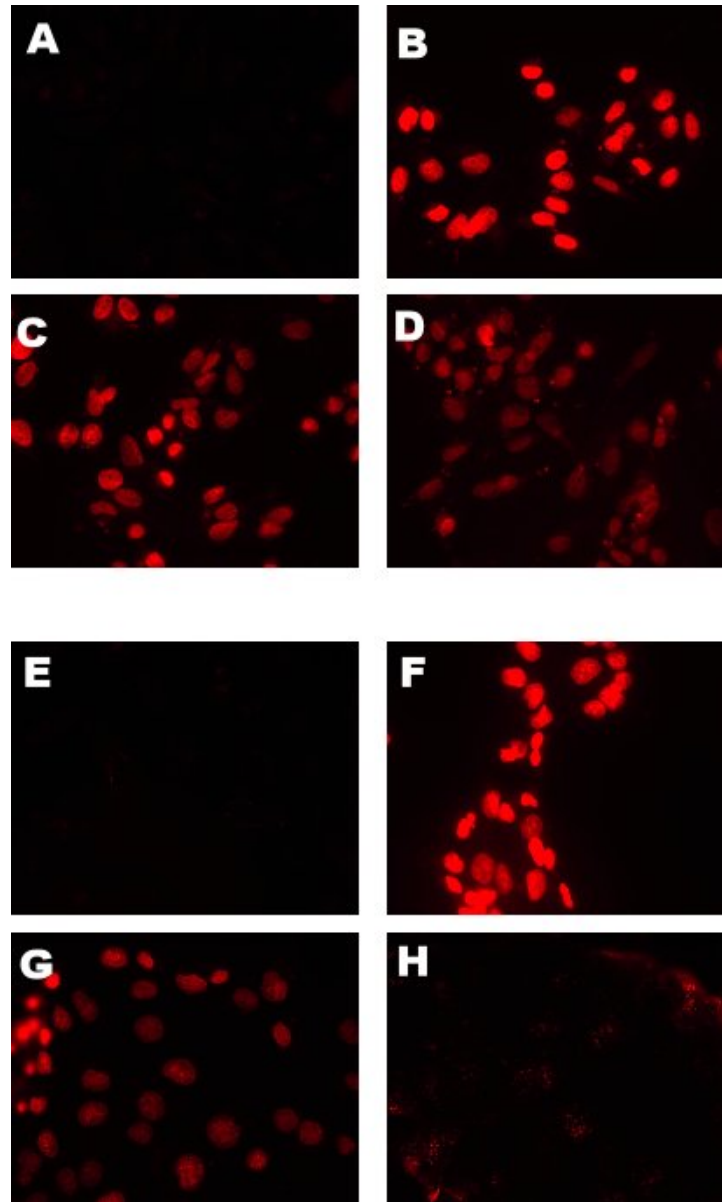


Abb. 3.10. Mikroskopische Aufnahmestudien an humanen Melanomzellen (MeWo) und Prostatakarzinomzellen (DU145)

A-D: MeWo; E-H: DU145

A und E: unbehandelte Kontrollzellen; B und F: freies Doxorubizin; C und G: AVE3 DOX; D und H: AVE9 35%Chol DOX

Die Zellen wurden für eine Stunde mit den entsprechenden Formulierungen inkubiert und anschließend untersucht. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen bei 200-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungsdauer von 5 Sekunden (Gleiches gilt auch für Abb. 3.11.)

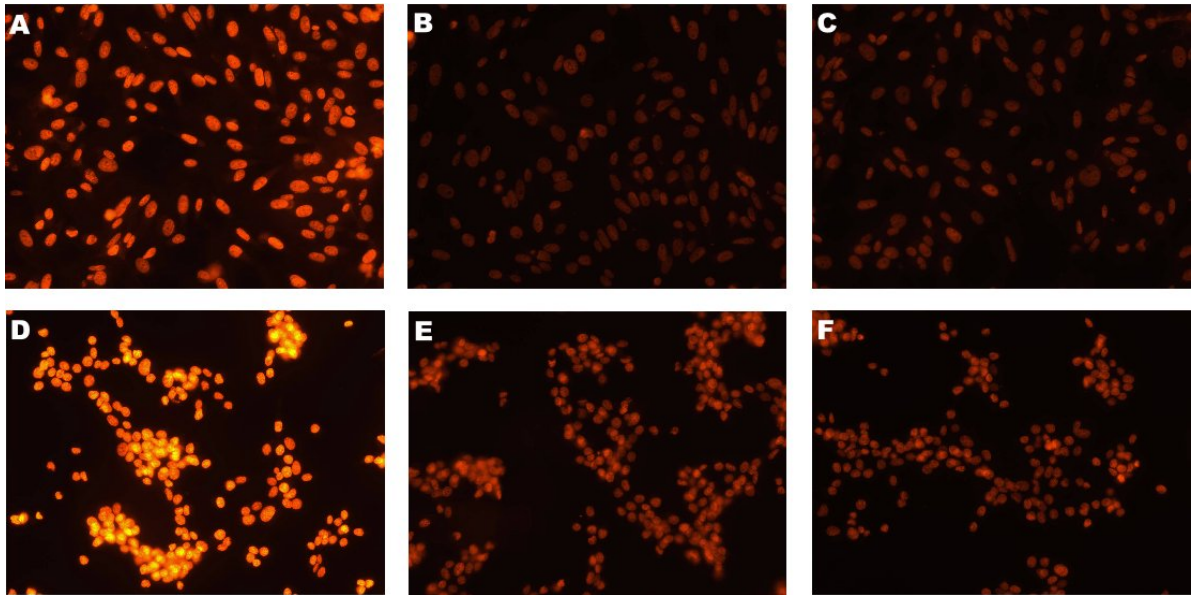


Abb. 3.11. Mikroskopische Aufnahmezellen an humanen Melanomzellen (MeWo) und murinen Kolonkarzinomzellen (colon26)

A-C: MeWo; D-F: colon26 (bei 100-facher Vergrößerung)

A und D: freies Doxorubizin; B und E: AVE9 50% Chol DOX; AVE9 35% Chol DOX

Die Abb. 3.11. verdeutlicht, dass die Erhöhung des Cholesterolgehaltes keinen Einfluß auf die Aufnahme hatte, da der Abbildung kein Unterschied in der Stärke der Fluoreszenz entnommen werden konnte.

3.2.3.2. TOXIZITÄT

Die zytotoxische Wirkung des freien oder liposomalen Doxorubizins sollte an verschiedenen kultivierten Zellen mittels eines Toxizitätsassays (s. Abschnitt 6.7.2.10.) untersucht werden.

Da für die AVE3 DOX eine lange Plasmaverweildauer des liposomalen Doxorubizins in späteren *in vivo* Versuchen nicht zu erwarten war, wurde für einen ersten Vergleich von AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX sowie AVE9 50% Chol DOX zunächst eine kurze Inkubationszeit des freien oder liposomal verpackten Doxorubizins von 8 Stunden gewählt.

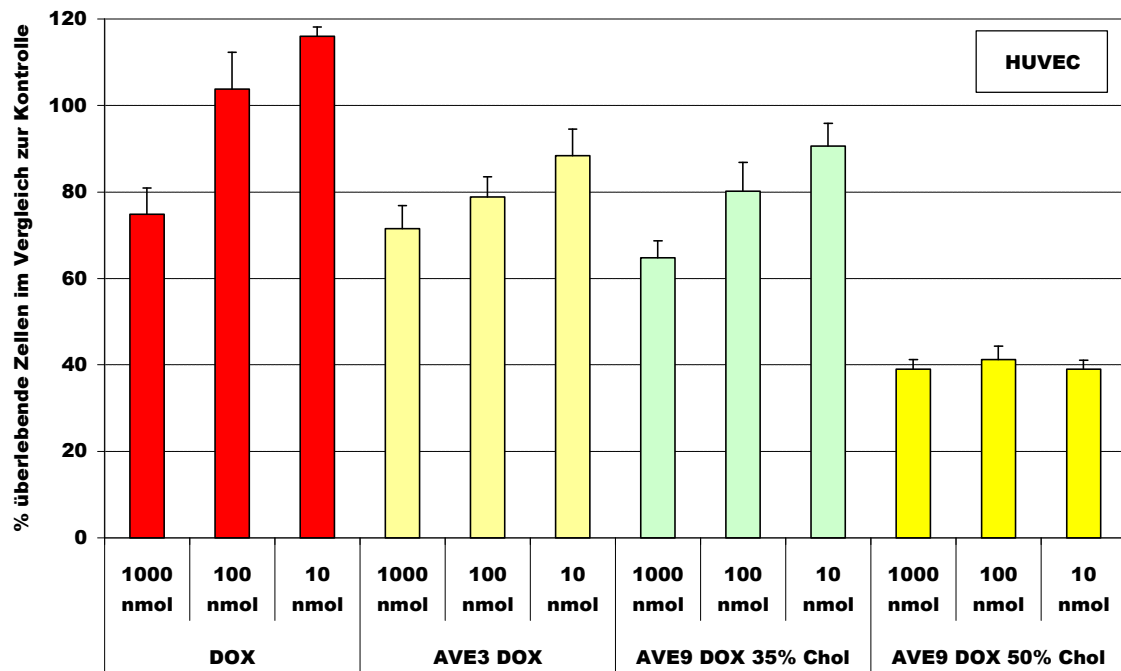


Abb. 3.12. Toxizität von freiem Doxorubizin, AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX sowie AVE9 50% Chol DOX untersucht an humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) nach 8 Stunden

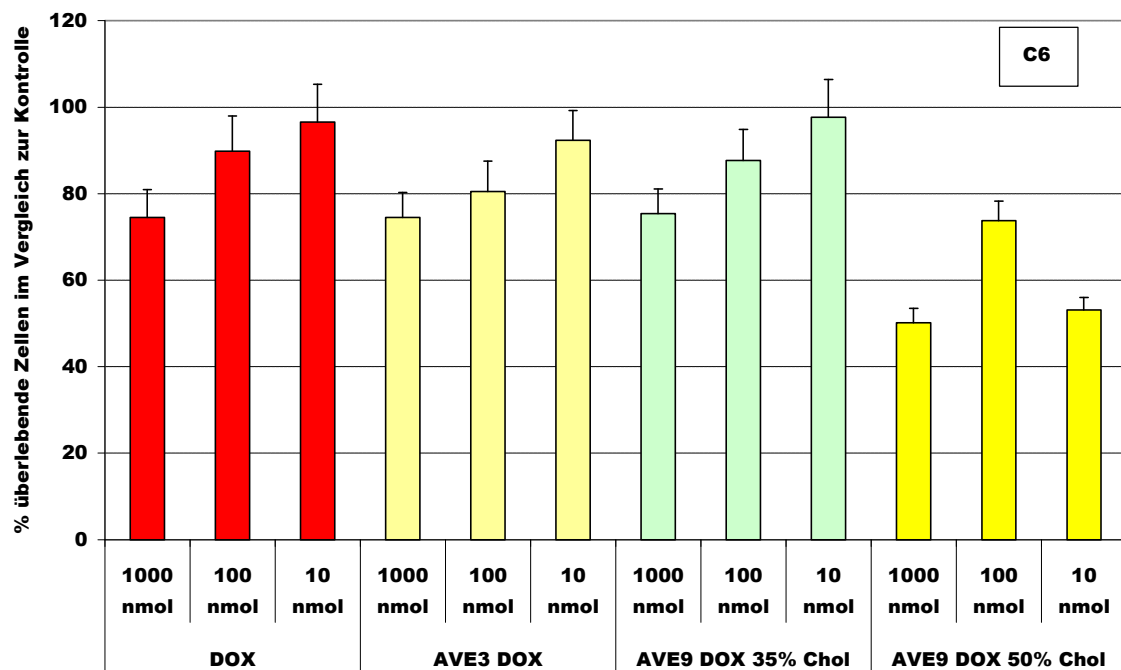


Abb. 3.13. Toxizität von freiem Doxorubizin, AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX sowie AVE9 50% Chol DOX untersucht an Rattenglioblastomzellen (C6) nach 8 Stunden

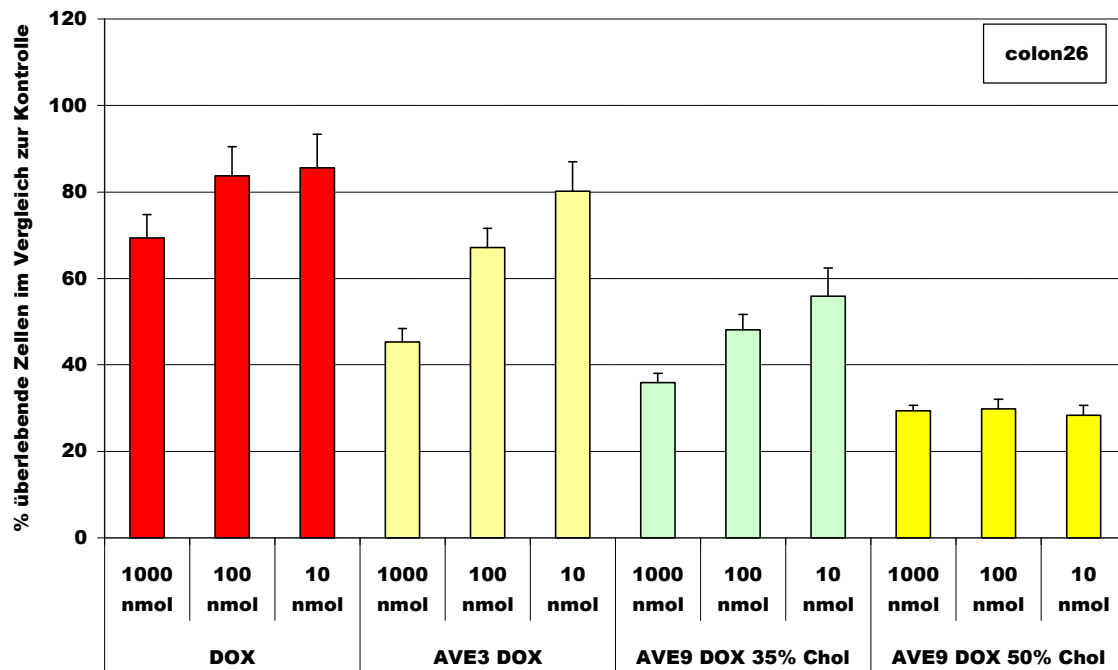


Abb. 3.14. Toxizität von freiem Doxorubizin, AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX sowie AVE9 50% Chol DOX untersucht an murinen Kolonkarzinomzellen (colon26) nach 8 Stunden

Die Abbildungen 3.12. bis 3.14. zeigen, dass Doxorubizin unterschiedlich toxisch auf verschiedene Zellen wirkte und mit der Verwendung niedrigerer Konzentrationen abnahm. Insbesondere für HUVEC- und C6-Zellen zeigten die AVE3 DOX und AVE9 35%Chol DOX keine höhere oder sogar eine geringere Toxizität als das freie Doxorubizin. Die AVE9 50%Chol DOX zeigten für alle untersuchten Zellen die höchste Toxizität zumal hier eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit in diesem Dosisbereich nach 8 Stunden nicht auszumachen war.

Um insbesondere die AVE9 mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt, für die *in vivo* eine deutlich längere Zirkulationsdauer des liposomalen Doxorubizins zu erwarten ist, hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung auf humane Melanom- und Kolonkarzinomzellen eingehender zu untersuchen, wurden zwei weitere längere Inkubationsdauern - 24 und 48 Stunden - gewählt.

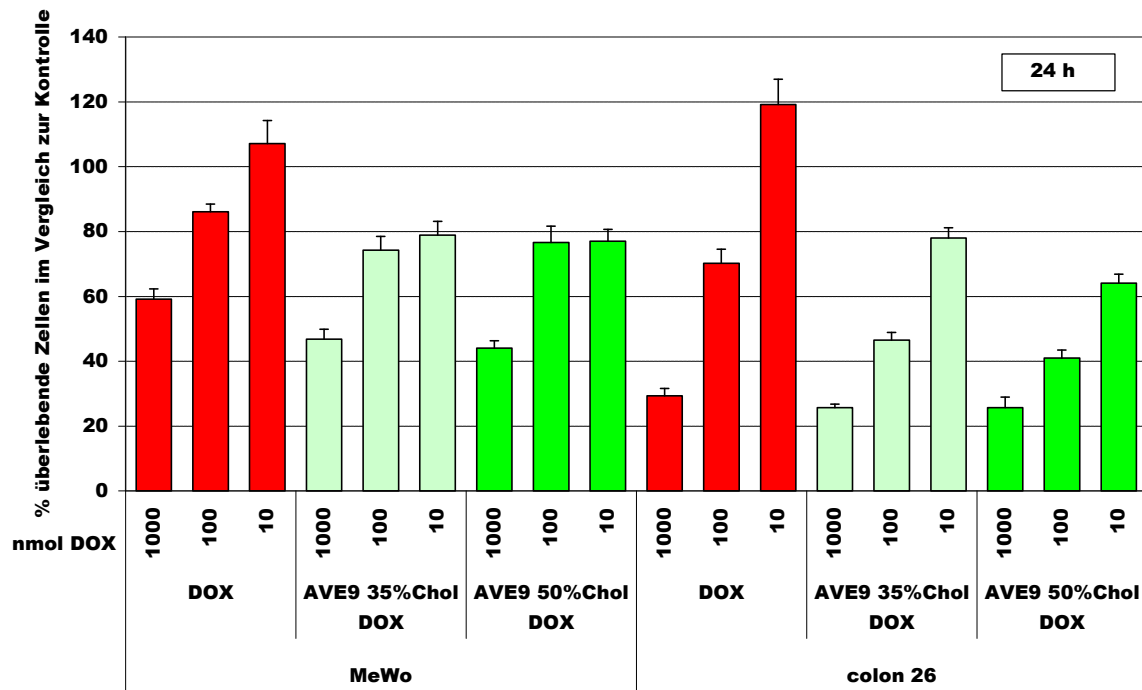


Abb. 3.15. Toxizität von freiem Doxorubizin, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50% Chol DOX untersucht an humanen Melanom (MeWo)- und Kolonkarzinomzellen (colon26) nach 24 Stunden

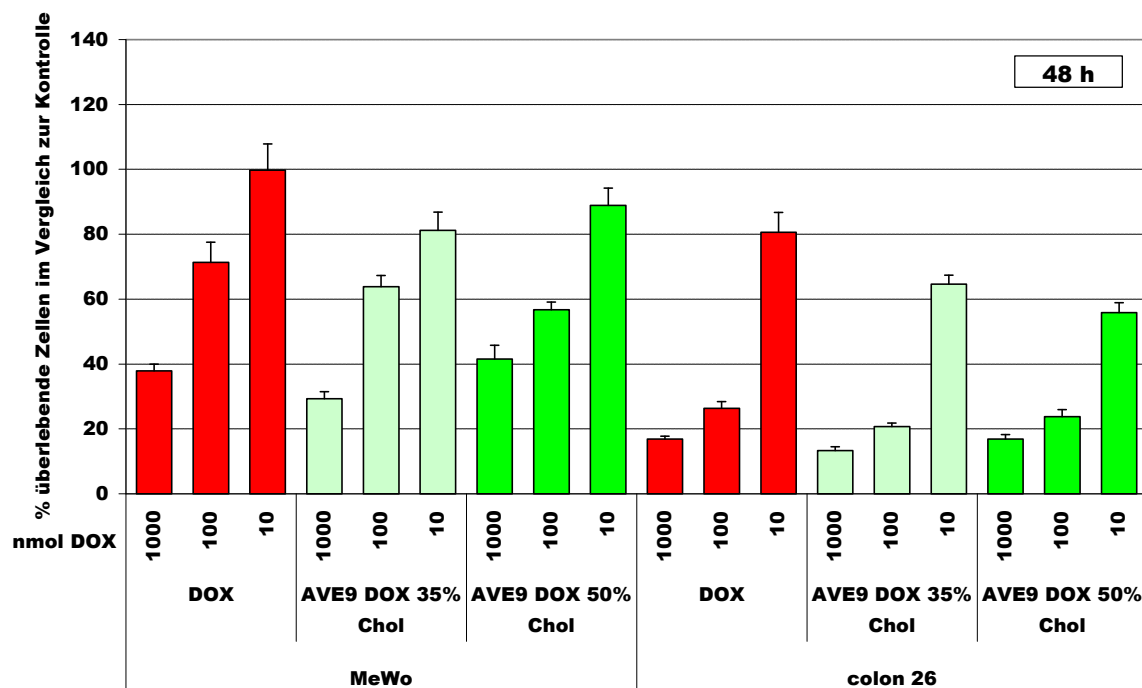


Abb. 3.16. Toxizität von freiem Doxorubizin, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50% Chol DOX untersucht an humanen Melanom (MeWo)- und Kolonkarzinomzellen (colon26) nach 48 Stunden

Nach 24-stündiger Inkubation zeigte das liposomale Doxorubizin gegenüber dem freien Doxorubizin in jeder Konzentration und auf beiden untersuchten Zellen eine stärkere toxische Wirkung, wobei ein Unterschied zwischen den untersuchten AVE9-Formulierungen mit einem unterschiedlichen Cholesterolgehalt nicht auszumachen war. Nach einer 48-stündigen Inkubation nivellierten sich die Unterschiede zwischen freiem und liposomalem Doxorubizin (s. Abbildungen 3.15. und 3.16.). Hierbei ist jedoch bedenken, dass eine derart lange Verfügbarkeit des freien Doxorubizins zwar *in vitro* simuliert werden kann, *in vivo* jedoch infolge seiner schnellen Elimination kaum zu erwarten ist (s. hierzu insbesondere Abschnitt 3.2.4.1.).

3.2.3.3. STABILITÄT NACH INTERAKTION MIT HUMANEM PLASMA

Erste Hinweise auf eine mögliche Erklärung für das spätere *in vivo* Verhalten des liposomalen Doxorubizins in verschiedenen Formulierungen sollte eine Untersuchung des Vermögens der Liposomen liefern, das verpackte Doxorubizin auch nach Interaktion mit humanem Plasma nicht frühzeitig freizusetzen.

Hierzu wurde freies oder liposomales Doxorubizin unterschiedlich lang mit humanem Plasma inkubiert. Liposomales Doxorubizin ließ sich anschließend durch gelchromatographische Auftrennung von freiem oder an Proteine gebundenem Doxorubizin trennen (s. Abschnitt 6.7.4.1. und 6.7.4.2.).

Das Verhalten von freiem oder liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX und AVE9 50%Chol DOX zeigen die Abbildungen 3.17. bis 3.19.: Hier wird deutlich, dass sich liposomales Doxorubizin in den frühen Fraktionen 1 bis 7 wiederfand, freies Doxorubizin hingegen in den späten Fraktionen 13 bis 20. In den mittleren Fraktionen 8 bis 12 wurde an Protein gebundenes Doxorubizin eluiert (siehe hierzu insbesondere auch die Abbildung 2.10.).

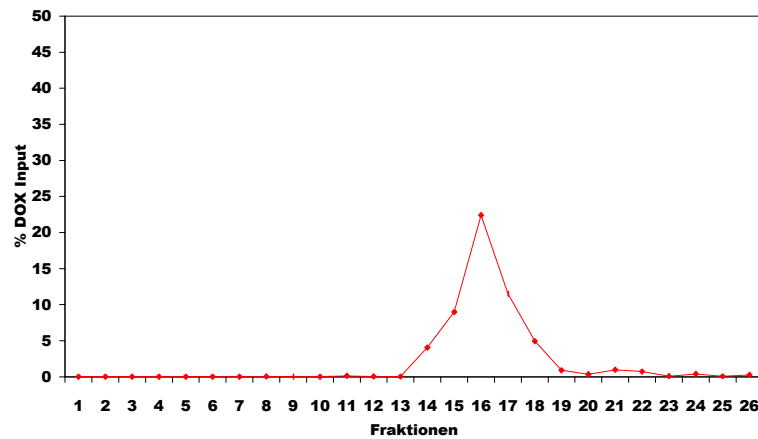


Abb. 3.17. Säulenchromatographische Auftrennung von freiem Doxorubizin

Aufgetrennt wurden 20 µg Doxorubizin über eine Sepharose 4B Säule. Gesammelt wurden Fraktionen von jeweils 560 µl (Diese Angaben gelten gleichermaßen für die nachfolgenden Abbildungen 3.18. bis 3.23.).

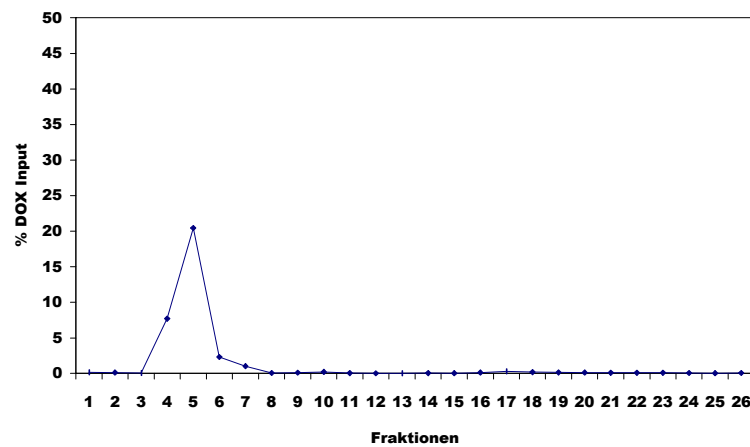


Abb. 3.18. Säulenchromatographische Auftrennung von liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX

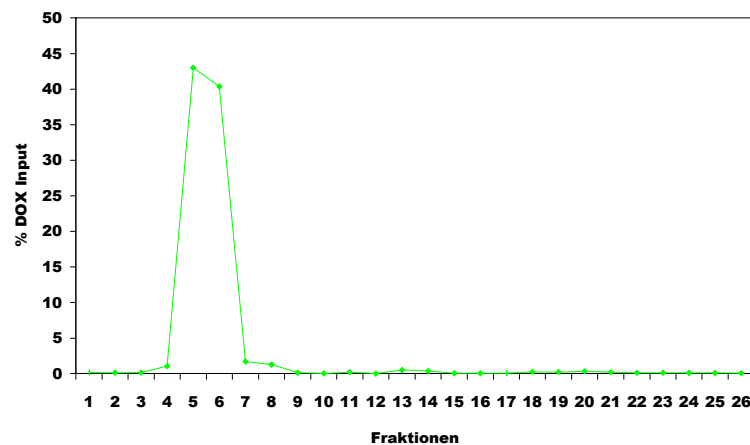


Abb. 3.19. Säulenchromatographische Auftrennung von liposomalem Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die genannten Fraktionen gepoolt, um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit das verpackte Doxorubizin in den Liposomen verpackt, an Proteine gebunden oder frei vorliegt. Zu diesem Zwecke wurde wie in Abbildung 3.20. ersichtlich, zunächst das gelchromatographische Verhalten von freiem oder liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX sowie AVE9 50%Chol DOX ohne eine vorherige Inkubation mit humanem Plasma untersucht und verglichen. Für die AVE3 DOX liegen etwa 95 % des Doxorubizins in liposomaler Form vor, während 30 % frei vorliegen. Für beide AVE9-Formulierungen finden sich 90-95 % in den Liposomen wieder, nur etwa 5 % liegen nach der säulenchromatographischen Trennung frei vor.

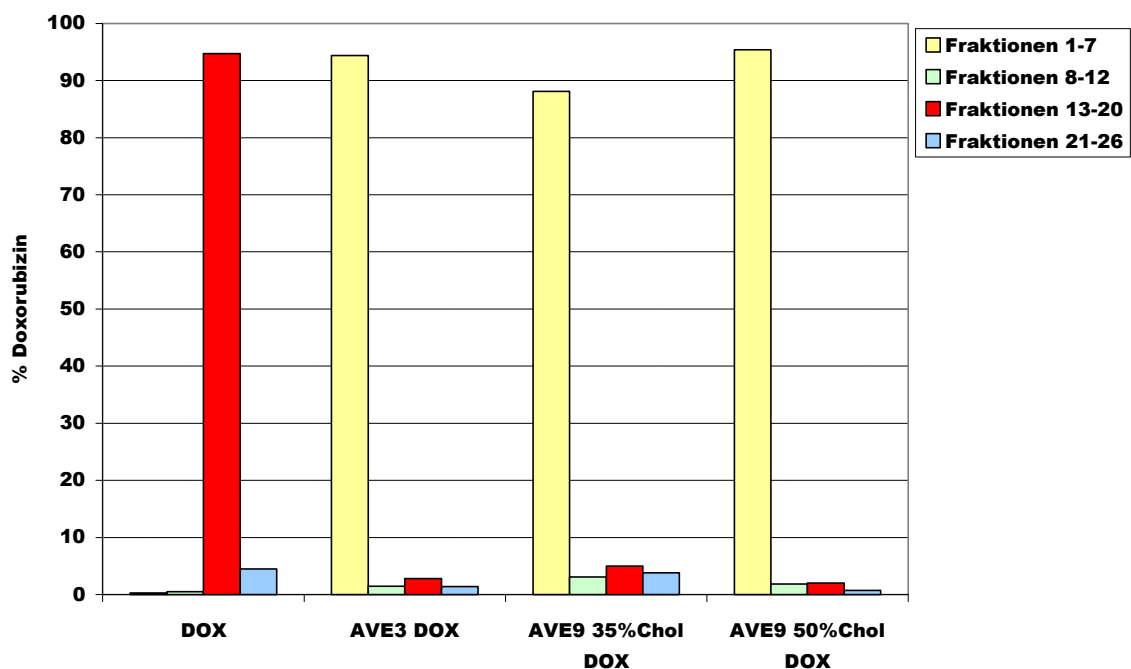


Abb. 3.20. Säulenchromatographische Auftrennung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX nach 15-minütiger Inkubation mit PBS

Gepoolt wurden die Fraktionen 1-7 (hier findet sich das liposomale Doxorubizin), 8-12 (an Proteine gebundenes Doxorubizin), 13-20 (freies Doxorubizin) und 21-26 (Nachlauf). Die Wiederfindungsraten des eingesetzten Doxorubizins wurden auf 100 % normiert, um die Werte verschiedener Versuchstage und Formulierungen hierzu in Relation setzen zu können. Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 80-100 %. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die Abbildungen 3.21. bis 3.23. .

Nach 15 minütiger Inkubation der jeweiligen Doxorubizin-Formulierungen mit humanem Plasma änderte sich für die untersuchten AVE9-Formulierungen wenig an dem Ergebnis der chromatographischen Auftrennung. Bei den AVE9 35%Chol DOX sank der Anteil des verpackten Doxorubizins um 5-10 %, der Anteil des freien Doxorubizins nimmt entsprechend zu; nahezu unverändert blieben die AVE9 50%Chol DOX. Lediglich bei den AVE3 DOX sank der Anteil liposomalen Doxorubizins deutlich von über 90 % auf weniger als 55 %, während der Anteil freien Doxorubizins von zuvor weniger als 5 % auf nunmehr über 35 % stieg (siehe Abbildung 3.21.).

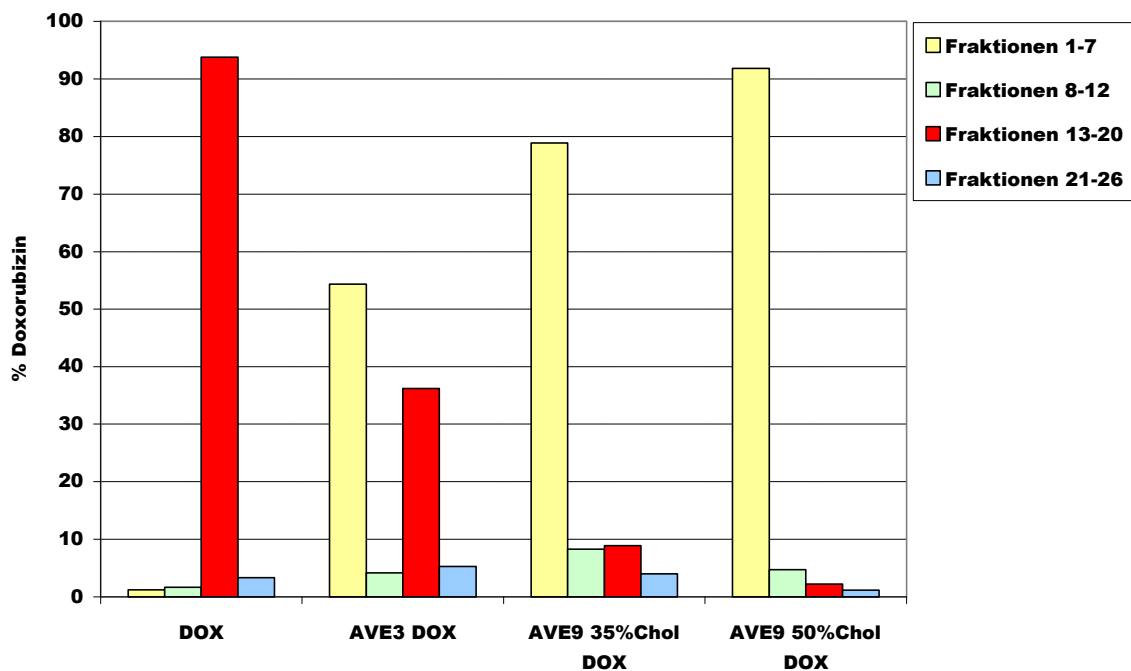


Abb. 3.21. Säulenchromatographische Auftrennung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX nach 15-minütiger Inkubation mit humanem Plasma bei 37 °C

Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung sind der Abb. 3.20. zu entnehmen.

Nach Inkubation der Liposomen über Nacht lagen im Falle der AVE3 DOX nur noch 25 % des Doxorubizins in verpackter Form vor, nahezu 60 % waren in freier Form zu finden, der Anteil des an Proteine gebundenen

Doxorubizins war auf 10 % gestiegen. Beide Formulierungen der AVE9 hatten nach der Inkubation das Doxorubizin noch zu etwa 40 % verpackt, etwa 40 % lagen in freier Form vor, weitere 15 % waren an Proteine gebunden (siehe Abbildung 3.22.).

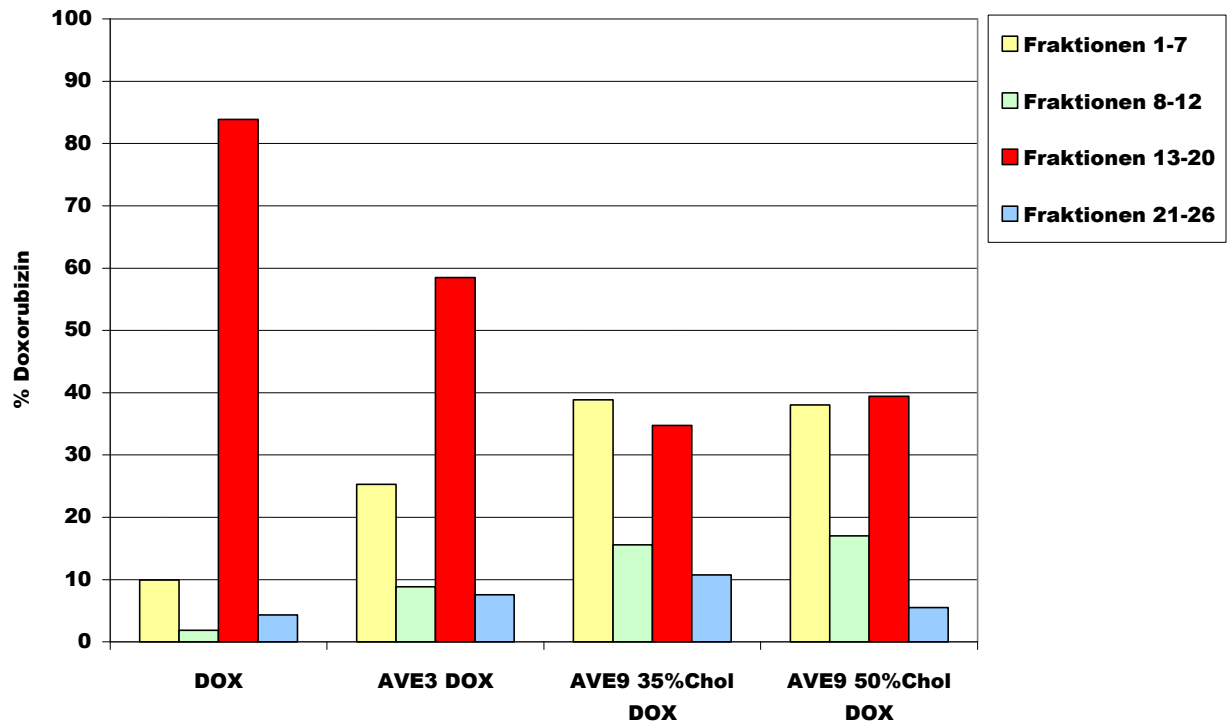


Abb. 3.22. Säulenchromatographische Auftrennung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX nach Inkubation über Nacht mit humanem Plasma bei 37 °C

Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung sind der Abb. 3.20. zu entnehmen.

Um die Kinetik der Freisetzung des verpackten Doxorubizins insbesondere für AVE9 50%Chol DOX eingehender zu untersuchen, wurden diese unterschiedlich lang mit humanem Plasma inkubiert und mit der Ausgangsformulierung ohne vorherige Inkubation verglichen (siehe Abbildung 3.23.). Zu Beginn lagen über 90 % des Doxorubizins in den AVE9 50%Chol verpackt vor. Nach 15 minütiger Inkubation in humanem Plasma änderte sich hieran nichts (siehe oben). Nach einstündiger Inkubation mit humanem Plasma lagen noch nahezu 50 % des Doxorubizins in verpackter Form vor, etwa 30 % sind freigesetzt worden. Nach einer zweistündigen

Inkubation lagen etwa 40 % gleichermaßen in freier und verpackter Form vor, nach 6 Stunden Inkubation waren noch etwa 35 % des Doxorubizins verpackt, etwa 50 % wurden nun freigesetzt. Nach Inkubation über Nacht lagen demgegenüber nur noch 40 % des Doxorubizins in freier Form vor, da nunmehr der Anteil des an Proteine gebundenen Doxorubizins von etwa 10 % nach 6 Stunden auf etwa 20 % gestiegen war. Der Anteil verpackten Doxorubizins nach einer solchen Inkubation über Nacht betrug etwa 40 %.

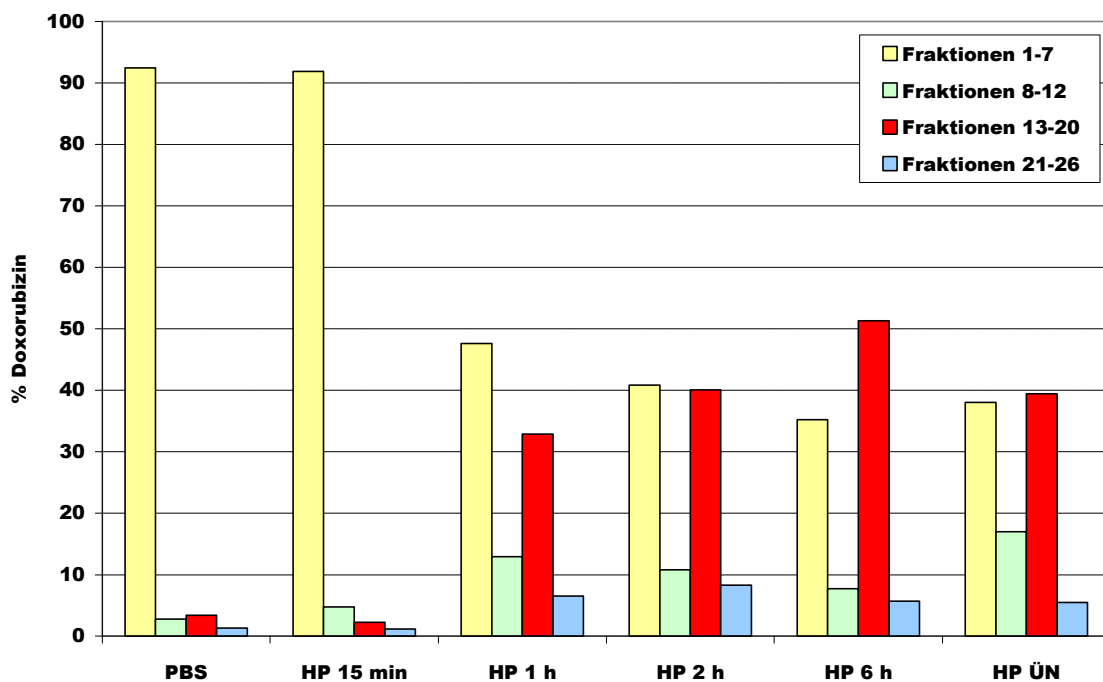


Abb. 3.23. Säulenchromatographische Auftrennung von liposomalem Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX ohne, bzw. nach unterschiedlich langer Inkubation mit humanem Plasma bei 37 °C

Nähere Angaben zur Durchführung und Auswertung sind der Abb. 3.20. zu entnehmen.

3.2.4. PHYSIOLOGISCHE *IN VIVO* CHARAKTERISIERUNG

Plasmaverweilzeiten, Organverteilungen, Tumorakkumulation und therapeutische Wirksamkeit

3.2.4.1. KINETIKEN UND ORGANVERTEILUNGEN SOWIE TUMORAKKUMULATION

Nach den Aussagen aus der physiologischen *in vitro* Charakterisierung der Liposomen hinsichtlich ihrer Stabilität sollte nun die *in vivo* Untersuchung der Plasmaverweildauer, der Organverteilung sowie der Tumorakkumulation von freiem und liposomalem Doxorubizin folgen.

Dazu wurden Nacktmäusen Colon26- oder A549-Zellen intradermal appliziert und nach Etablierung der Tumore 200 µg Doxorubizin in freier oder liposomaler Form intravenös appliziert. Nach festgelegten Zeitpunkten wurden Blutproben retroorbital entnommen und die Organe präpariert (s. Abschnitt 6.7.3.3.). Die Bestimmung der Doxorubizinmengen erfolgte via HPLC durch Frau Tanja Hilka von der Firma vectron therapeutics AG in Marburg (s. Abschnitt 6.7.4.11.2.).

Der Abbildung 3.24. sind die Plasmaverweildauerkurven von freiem Doxorubizin, AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX, AVE9 50%Chol DOX sowie DOXIL® zu entnehmen. Freies Doxorubizin und liposomales Doxorubizin in Form der AVE3 DOX wiesen eine nahezu identische Blutelimination auf, die der AVE9 35%Chol DOX war demgegenüber leicht verzögert. Eine deutliche Verlängerung der Blutzirkulation zeigten hingegen die AVE9 50%Chol DOX, welche nur hinter DOXIL® zurückblieben.

Die Tabelle 3.3. verdeutlicht diesen Sachverhalt anhand der nur sehr kurzen Halbwertszeit von weniger als 15 min. für freies Doxorubizin gegenüber den Halbwertszeiten von deutlich über 100 min. für AVE9 50%Chol DOX und über 500 min. für DOXIL®. Bereits nach 20 min. waren vom freien Doxorubizin nur noch weniger als 12 % nachweisbar, wohingegen vom liposomalen Doxorubizin der AVE9 50%Chol DOX noch deutlich über 60 % nachweisbar waren. Nach 360 min. war die Menge nachweisbaren freien Doxorubizins

im Bereich der unteren Nachweisgrenze, liposomales Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX und DOXIL® war demgegenüber noch zu über 10 %, bzw. 50 % nachweisbar. Diese Sachverhalte werden zudem durch die jeweiligen Flächen unter den Kurven bestätigt.

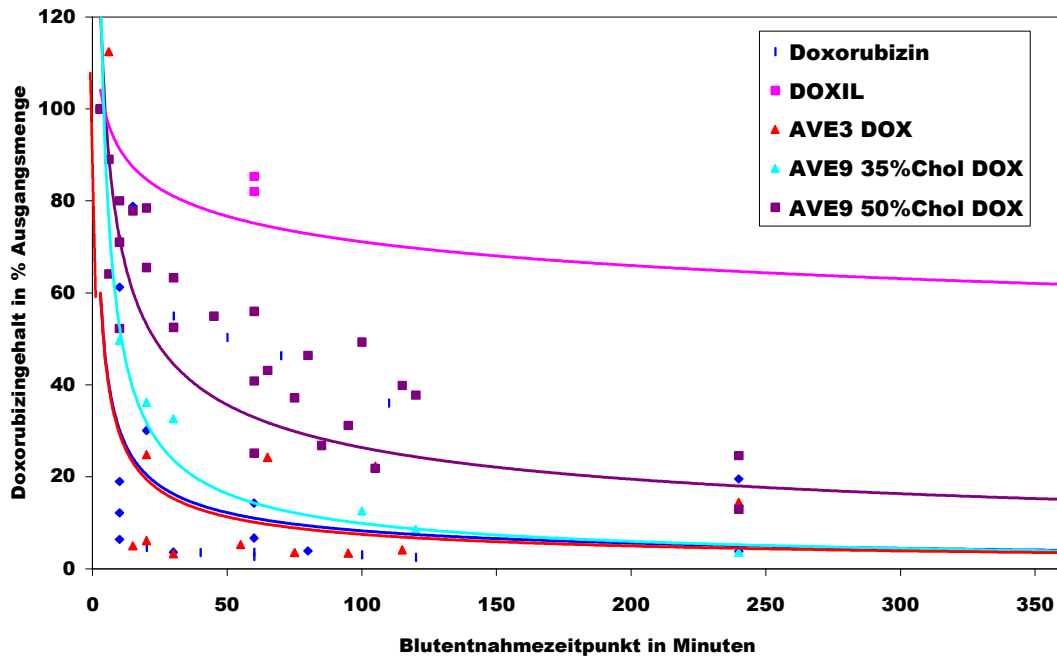


Abb. 3.24. Elimination von freiem Doxorubizin und liposomal verpacktem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX, AVE9 50%Chol DOX und DOXIL®

Die Werte nach 3 min. wurden hierzu auf 100 % normiert, um alle nachfolgenden Werte hierzu in Relation setzen zu können. Die Kurven wurden durch einen logarithmischen Algorithmus aus den Punktwolken errechnet. Injiziert wurden 200 µg Doxorubizin.

Liposomen	tH	AUC	p20	p60	p120	p360
DOX	13,5 +/- 5,8	1652 +/- 897	11,9 +/- 7,2	6,9 +/- 5,3	3,2 +/- 0,9	3,4 +/- 0,5
AVE3 DOX	44,1 +/- 17,6	3431 +/- 3070	14,9 +/- 13,4	14,7 +/- 13,3	13,2 +/- 12,8	11,1 +/- 4,7
AVE9 35%Chol DOX	80,2	4272,0	36,2	12,6	8,6	3,7
AVE9 50%Chol DOX	121,5 +/- 42,8	9866 +/- 3209	62,2 +/- 12,5	40,4 +/- 11,0	33,2 +/- 9,8	14,0 +/- 4,8
DOXIL	504,7 +/- 145,8	26513 +/- 1711	-	83,6 +/- 2,3	-	58,2 +/- 8,6

Tab. 3.1. Pharmakokinetische Parameter von freiem Doxorubizin und liposomal verpacktem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX, AVE9 50%Chol DOX und DOXIL®

Die Halbwertszeit tH wurde für die Werte von 3 min. bis 360 min. ausgehend von einer monophasischen exponentiellen Elimination berechnet, wobei eine eventuell biphasische Elimination unberücksichtigt bleibt. Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC in %min.) wurde für die Werte von 3 min. bis 360 min. berechnet. Die Werte p_i zeigen die zu einer bestimmten Zeit t (in min.) noch prozentual nachweisbare Menge an Doxorubizin.

Der Abbildung 3.25. ist die Organverteilung von freiem Doxorubizin und liposomal verpacktem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX und AVE9 50%Chol DOX zu entnehmen. Freies Doxorubizin zeigte nach 6 Stunden in Leber, Milz und Tumor eine deutlich geringere Aufnahme gegenüber der liposomal verpackten Form, auffällig ist jedoch die bei liposomalem Doxorubizin fehlende Akkumulation in Lunge, Herz und Nieren. Das liposomale Doxorubizin in Form der AVE3 DOX zeigte eine deutlich stärkere Aufnahme in Leber (etwa 35 µg Doxorubizin je Gramm Gewebe) und Milz (etwa 25 µg Doxorubizin je Gramm Gewebe) als in Form der AVE9 50%Chol DOX (etwa 20 µg Doxorubizin je Gramm Gewebe für Leber und Milz). Nur das liposomale Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zeigte eine erkennbare Aufnahme im Tumor mit über 2 µg Doxorubizin je Gramm Tumorgewebe gegenüber den unter 1 µg Doxorubizin pro Gramm Tumorgewebe für freies oder liposomales Doxorubizin in Form der AVE3 DOX.

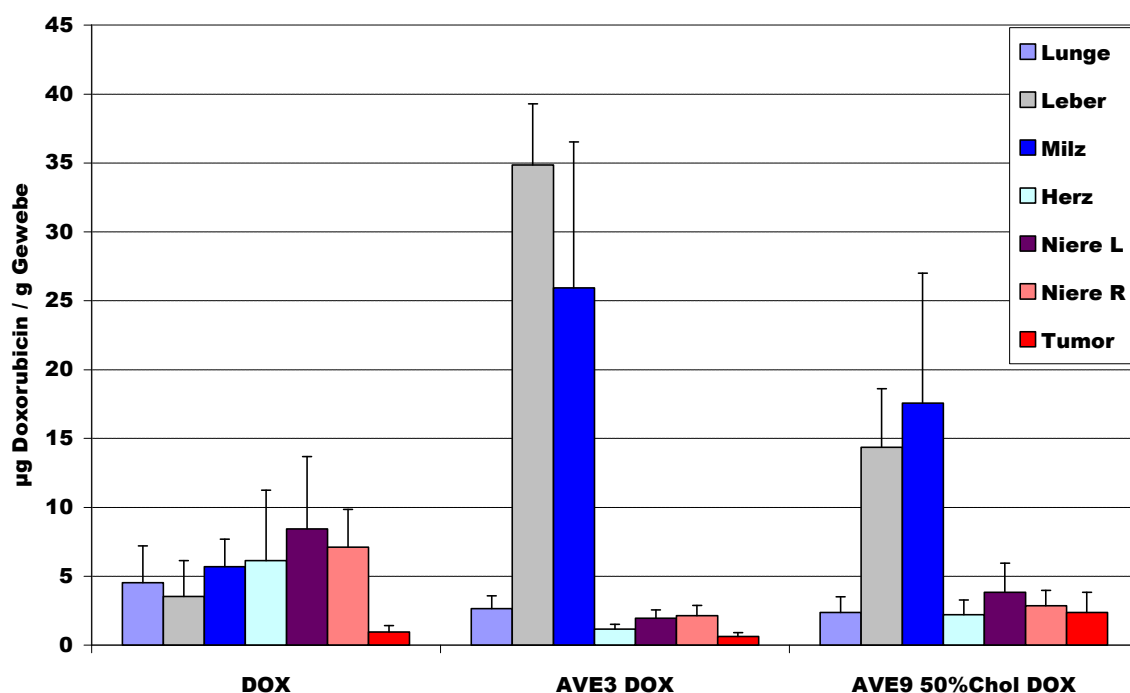


Abb. 3.25. Organverteilung von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX und AVE9 50%Chol DOX

Injiziert wurden je 200 µg Doxorubizin. Die Mäuse wurden nach 6 Stunden getötet.

Die Abbildung 3.26. auf der nächsten Seite verdeutlicht die zeitabhängige und liposomenspezifische Akkumulation von Doxorubizin in A549-Tumoren. Während freies Doxorubizin weder nach 1 noch nach 6 Stunden im Tumor mikroskopisch nachzuweisen ist, zeigt liposomales Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX zwar nicht nach 1 jedoch nach 6 Stunden eine deutliche Akkumulation im Tumor. Auch liposomales Doxorubizin in Form von DOXIL[®] ließ sich nach 6 Stunden deutlich im Tumor nachweisen, nicht jedoch in Form von AVE9 35%Chol DOX.

Abb. 3.26. (Nächste Seite) Tumorakkumulation von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE3 DOX, AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX sowie DOXIL[®]

Injiziert wurden je 200 µg Doxorubizin. Die Mäuse wurden nach 1 oder 6 Stunden getötet. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten intradermaler A549-Tumore in athymischen Mäusen bei 100-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungsdauer von 5 Sekunden. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Maus. A: Negativkontrolle; B: DOX nach 1 h; C: DOX nach 6 h; D: AVE9 50%Chol DOX nach 1 h; E: AVE9 50%Chol DOX nach 6 h; F: AVE9 35%Chol DOX nach 6 h; G: DOXIL[®] nach 6 h

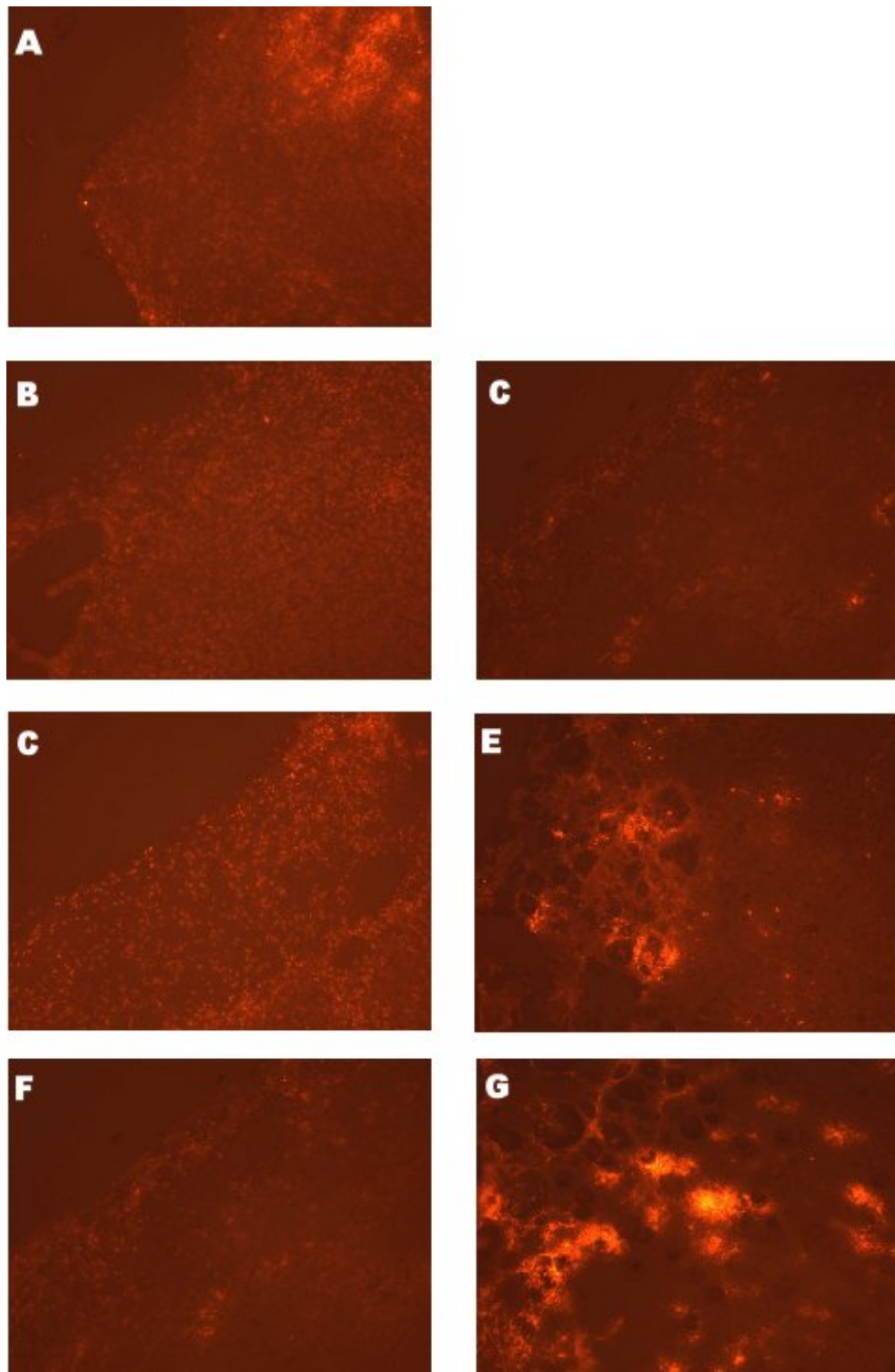


Abb. 3.26. (Erklärung siehe vorhergehende Seite)

Um insbesondere die Unterschiede von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX hinsichtlich der Tumorakkumulation und der Aufnahme im Herzen im Hinblick auf eine mögliche Effizienz unter Berücksichtigung möglicher Nebenwirkungen beurteilen zu können, wurden speziell der Tumor und das Herz nachfolgend miteinander verglichen.

Deutlich erkennbar ist die Aufnahme von freiem Doxorubizin im Herzen ohne eine erkennbare Akkumulation im Tumor, während für liposomales Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX der Sachverhalt gerade umgekehrt ist: deutliche Akkumulation im Tumor ohne erkennbare Aufnahme im Herzen (siehe hierzu Abbildung 3.27.).

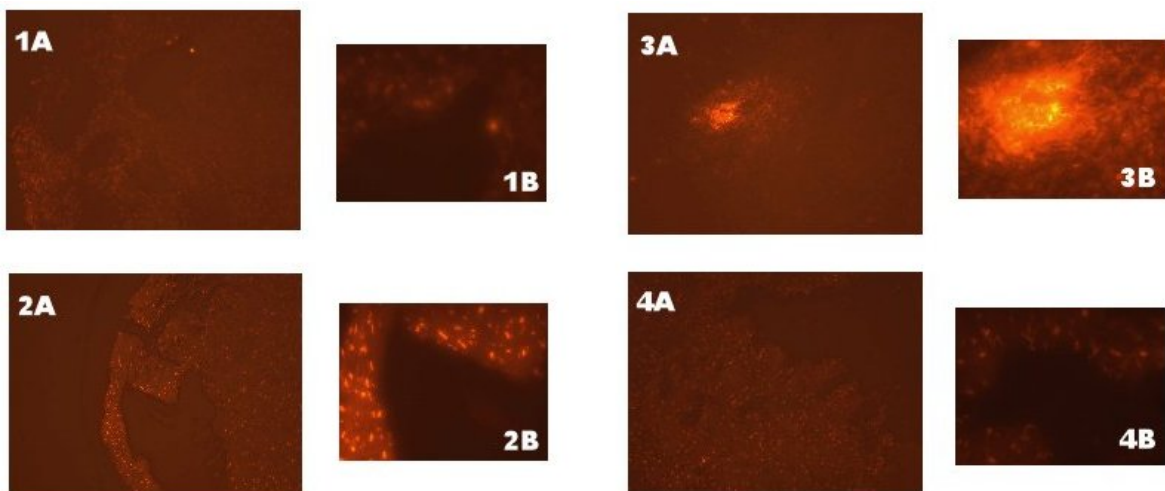


Abb. 3.27. Tumorakkumulation und Aufnahme im Herzen von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX

Injiziert wurden je 200 µg Doxorubizin. Die Mäuse wurden nach 6 Stunden getötet. Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten intradermaler Colon26-Tumore in athymischen Mäusen bei 100-(Bilder A) und 400-(Bilder B) facher Vergrößerung und gleicher Belichtungsdauer von 5 Sekunden.

1: freies Doxorubizin, Tumor

2: freies Doxorubizin, Herz

3: liposomales Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX, Tumor

4: liposomales Doxorubizin in Form von AVE9 50%Chol DOX, Herz

3.2.4.2. THERAPEUTISCHE WIRKSAMKEIT

Die therapeutische Wirkung der AVE9 DOX Formulierungen im Vergleich zu freiem Doxorubizin oder der bereits erhältlichen liposomalen Formulierung DOXIL® wurde im Tiermodell an athymischen Mäusen bei intradermal applizierten Kolonkarzinomzellen (Colon26) untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf die Tumorgroße und die Überlebensrate der untersuchten Tiere gerichtet wurde.

In einem ersten Experiment wurde zum einen die Wirksamkeit liposomalen Doxorubizins in Form von AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX gegenüber freiem Doxorubizin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht, zum anderen der Einfluß des unterschiedlichen Cholesterolgehalts in den AVE9 auf die Wirksamkeit. Dazu wurden an den Tagen 0², 2 und 5 des Versuches den Mäusen jeweils 4 mg freies oder liposomales Doxorubizin je kg Körpergewicht injiziert, die Kontrollgruppen blieben unbehandelt (s. Abschnitt 6.7.3.5.).

Insbesondere die Gruppe, denen die AVE9 50%Chol DOX injiziert worden waren, zeigten ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum, während das Tumorwachstum von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 35%Chol DOX zwar langsamer verlief als in der unbehandelten Kontrollgruppe, unter diesen beiden Gruppen war ein Unterschied im Tumorwachstum jedoch erst ab dem 10 Tag zugunsten des liposomalen Doxorubizins zu erkennen (siehe Abbildung 3.28.).

Wie der Abbildung 3.29. zu entnehmen ist, zeigten die mit AVE9 50%Chol DOX behandelten Mäuse eine deutlich längere Überlebenszeit als die mit freiem oder liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 35%Chol DOX

² Tag 0 war der Tag der erstmaligen Injektion der zu untersuchenden Therapeutika, der in der Regel 5 Tage nach der intradermalen Applikation der Tumorzellen erreicht wurde, wenn die Tumore gerade sichtbar und messbar waren.

behandelten Tiere, die jedoch auch länger überleben als die unbehandelte Kontrollgruppe.

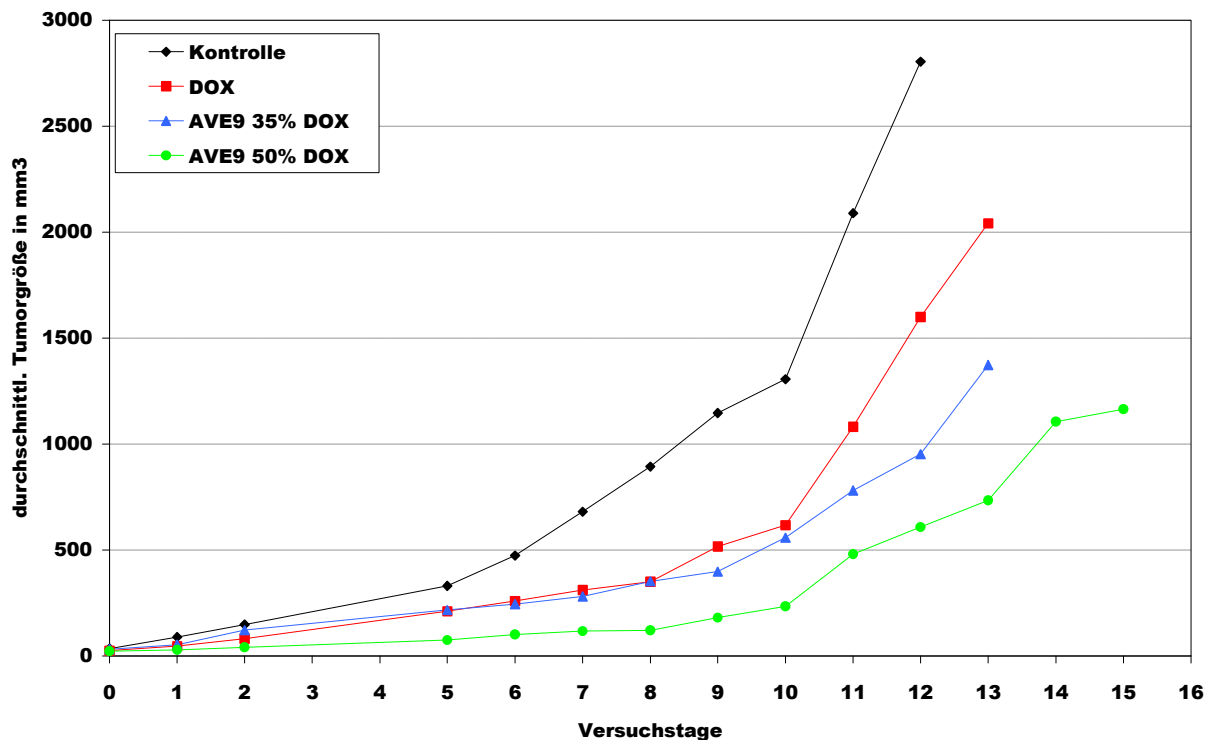


Abb. 3.28. Therapeutische Wirkung von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Athymischen Mäusen waren zuvor je 500.000 Colon26 Zellen intradermal appliziert worden, zu Beginn des Versuches waren die Tumore gerade meßbar. Diese Angaben gelten gleichermaßen für die nachfolgenden Abbildungen.

Injiziert wurden den Mäusen an den Tagen 0, 2 und 5 je 4 mg Doxorubizin in freier oder liposomaler Form je kg Körpergewicht. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 5 Mäusen. Die Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen sind der Tabelle 8.6. im Anhang 8.1. zu entnehmen.

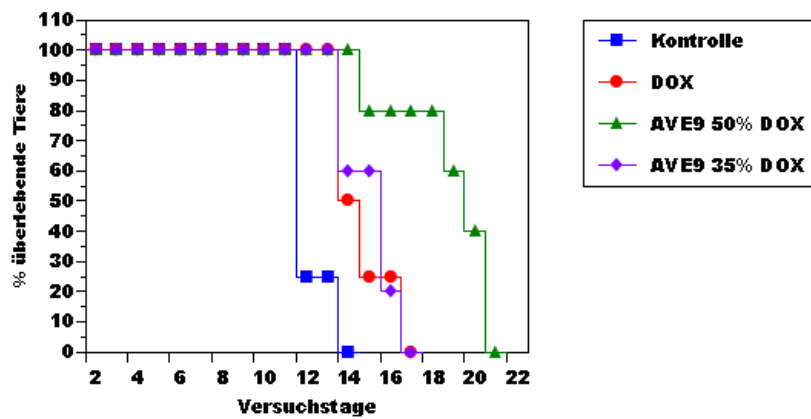


Abb. 3.29. Überlebensrate der Mäuse aus Abb. 3.28. während der Behandlung mit freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Tötungskriterien waren offene und nekrotische Tumore, ein schlechter Allgemeinzustand der Mäuse sowie ein Gewichtsverlust von mehr als 5 %.

Die Abbildung 3.30. verdeutlicht, dass durch Verdopplung der injizierten Doxorubizinmenge auf 8 mg je kg Körpergewicht sich zumindest für die liposomale Formulierung das Tumorwachstum noch weiter abbremsen ließ. Die Betrachtung der zugehörigen Kurve der Überlebensraten (siehe Abbildung 3.31.) verdeutlicht jedoch auch das in diesem Zusammenhang deutlich verkürzte Überleben der Mäuse nach Behandlung mit der höheren Doxorubizin-Menge.

Aufgrund der niedrigeren Überlebensrate bei Verwendung der hohen Doxorubizinmenge von 8 mg je kg Körpergewicht (siehe hierzu Abb. 3.31.) wurde im Folgenden mit 4 mg je kg Körpergewicht gearbeitet.

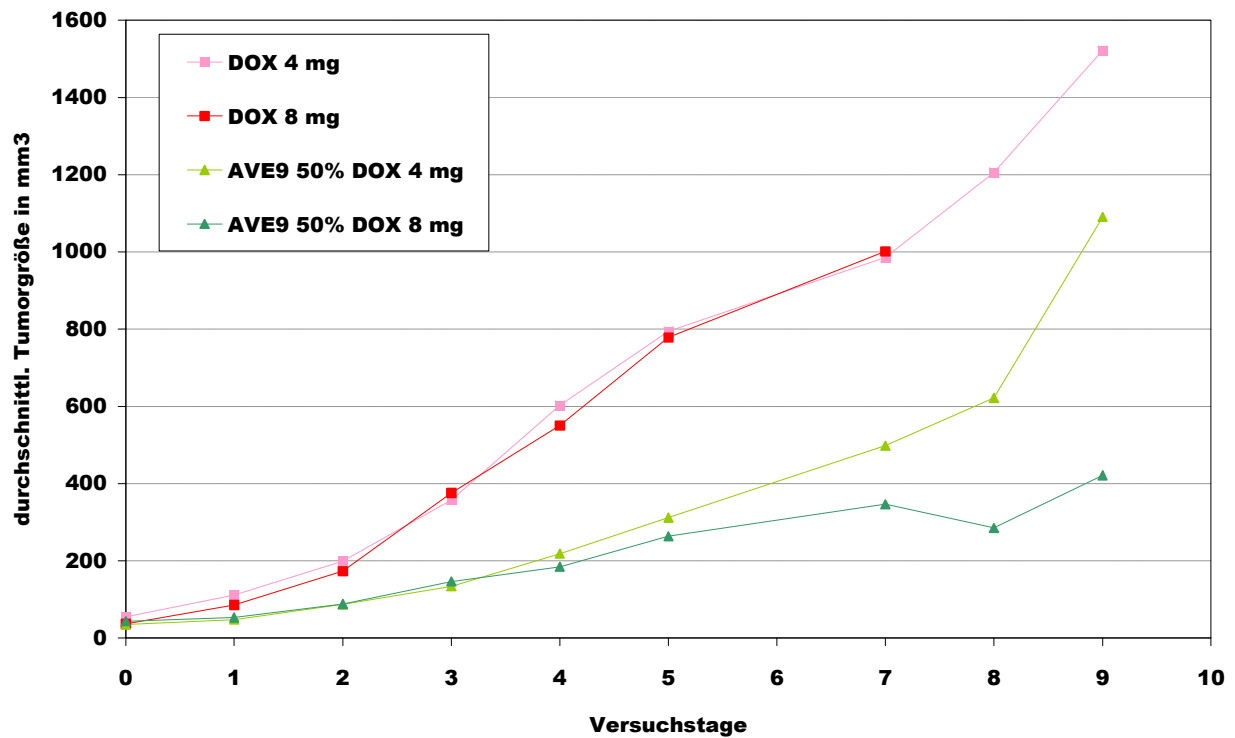


Abb. 3.30. Therapeutische Wirkung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX

Injiziert wurden den Mäusen an den Tagen 0, 2 und 5 je 4 oder 8 mg Doxorubizin in freier oder liposomaler Form je kg Körpergewicht. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 5 Mäusen. Die Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen sind der Tabelle 8.7. im Anhang 8.1. zu entnehmen.

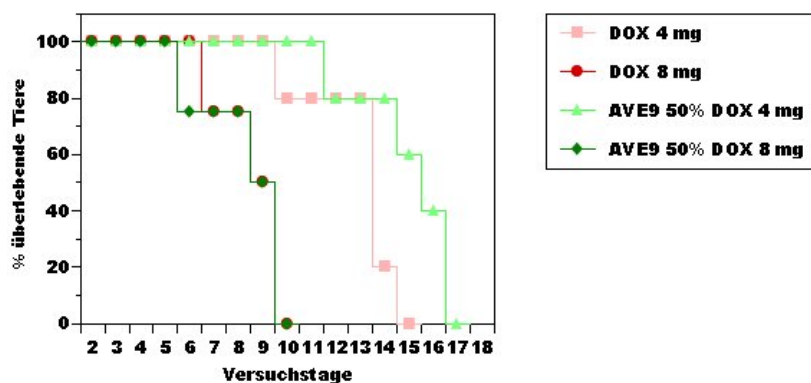


Abb. 3.31. Überlebensrate der Mäuse aus Abb. 3.30. während der Behandlung mit freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX

Erläuterungen zur Durchführung siehe Legende zur Abb. 3.29.

Zudem sollte in Anlehnung an die Ergebnisse aus dem Abschnitt 2.2.4.1.7. die Notwendigkeit von Sphingomyelin in der Lipidmembran der AVE9 50%Chol DOX für deren therapeutische Wirksamkeit untersucht werden. Hierzu wurden diese mit einer Formulierung verglichen, bei der das Sphingomyelin gegen Phosphatidylcholin ausgetauscht wurde (AVE9 50%Chol 0%SM DOX). Der Abbildung 3.32. ist zu entnehmen, dass sich das Tumorwachstum unter der Behandlung mit AVE9 50%Chol DOX deutlich gegenüber der Behandlung mit freiem Doxorubizin verlangsamt und in dieser Gruppe die Mäuse am längsten überleben (s. Abb. 3.33.), wohingegen während der Behandlung mit den AVE9 50%Chol 0%SM DOX kein Unterschied im Tumorwachstum zu der Behandlung mit freiem Doxorubizin auszumachen ist.

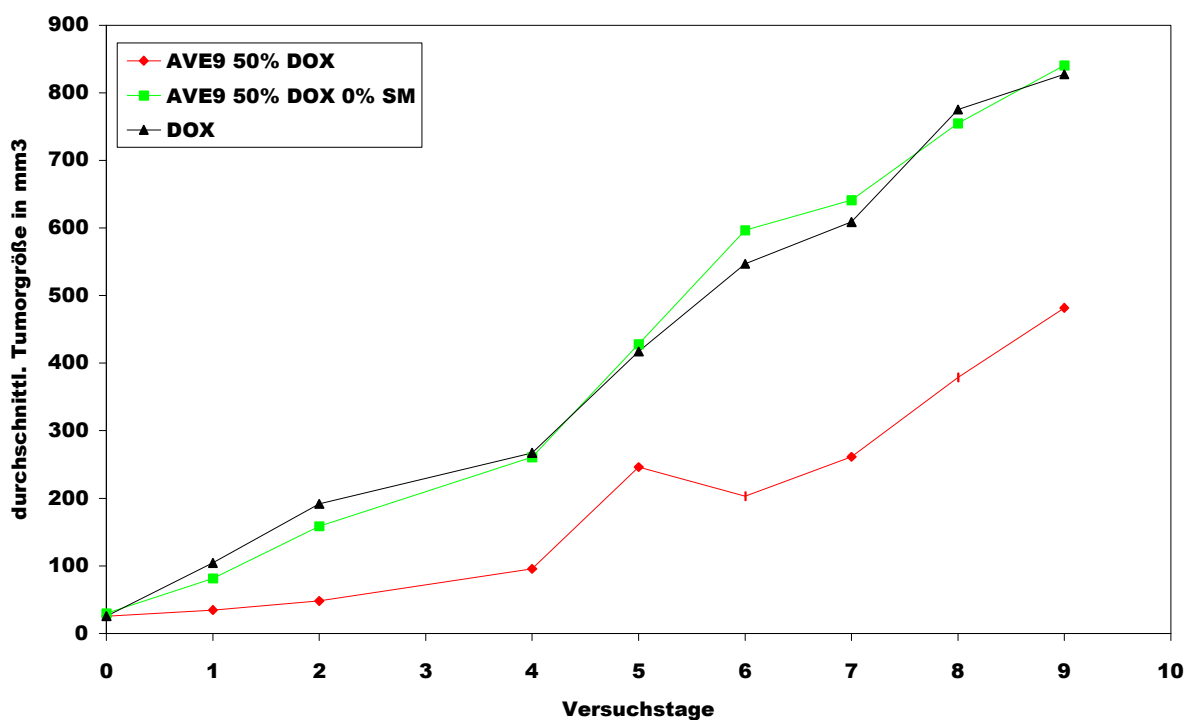


Abb. 3.32. Therapeutische Wirkung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX und AVE9 50%Chol 0%SM DOX

Injiziert wurden den Mäusen an den Tagen 0, 2 und 5 je 4 mg Doxorubizin in freier oder liposomaler Form je kg Körpergewicht. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 7 Mäusen. Die Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen sind der Tabelle 8.8. im Anhang 8.1. zu entnehmen.

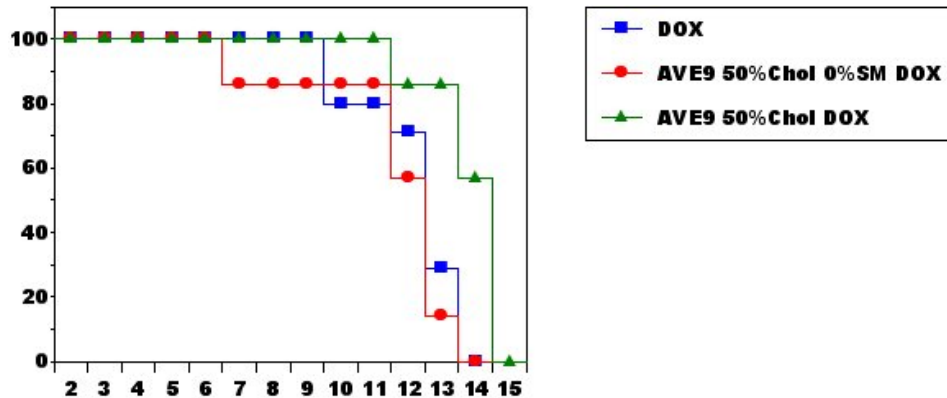


Abb. 3.33. Überlebensrate der Mäuse aus Abb. 3.32. während der Behandlung mit freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX und AVE9 50%Chol 0%SM DOX

Erläuterungen zur Durchführung siehe Legende zur Abb. 3.29.

In den Abbildungen 3.34. und 3.35. sollten abschließend die AVE9 50%Chol DOX mit der bereits klinisch eingesetzten Doxorubizin-Formulierung DOXIL® verglichen werden. Den Abbildungen ist das deutlich langsamere Tumorwachstum während der Behandlung mit AVE9 50%Chol DOX gegenüber dem Tumorwachstum während der Behandlung mit DOXIL® sowie die deutlich längere Überlebenszeit der Mäuse zu entnehmen (s. nächste Seite).

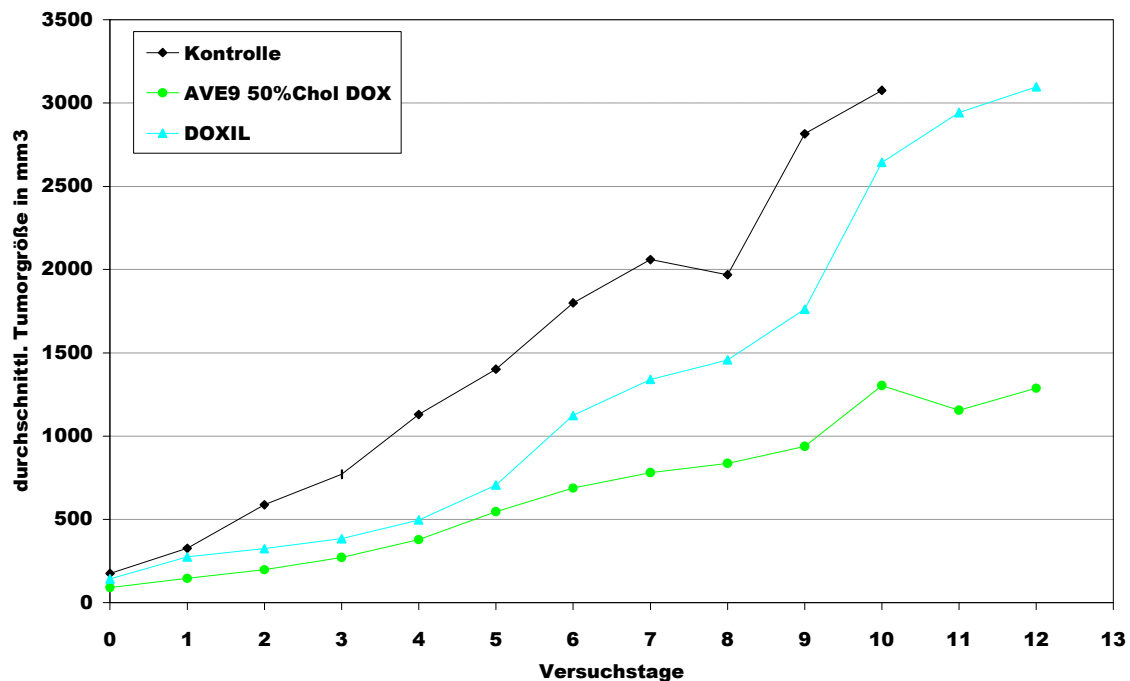


Abb. 3.34. Therapeutische Wirkung von AVE9 50%Chol DOX und DOXIL®

Injiziert wurden den Mäusen an den Tagen 0, 2 und 5 je 4 mg Doxorubizin in liposomaler Form je kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe wurde nicht injiziert.

Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 5 Mäusen. Die Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen sind der Tabelle 8.9. im Anhang 8.1. zu entnehmen.

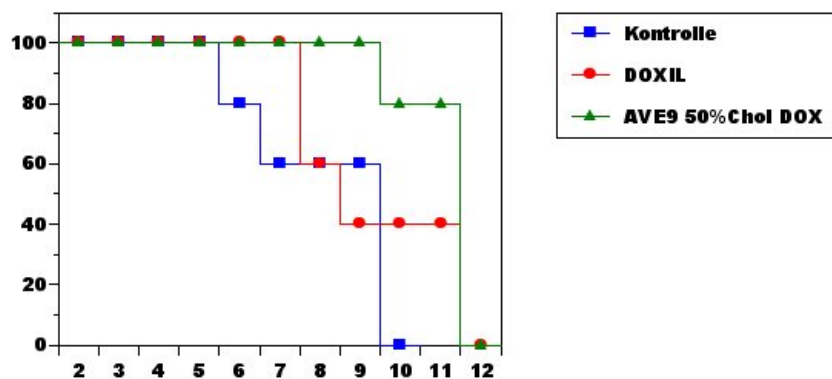


Abb. 3.35. Überlebensrate der Mäuse aus Abb. 3.34. während der Behandlung mit liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX und DOXIL® gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe

3.3. DISKUSSION UND AUSBLICK

Liposomen als Träger von Inhaltsstoffen für eine Antitumorthherapie - unterschiedliche Wirksamkeit als Folge unterschiedlicher physikochemischer sowie physiologischer Eigenschaften

3.3.1. DISKUSSION DER IN VITRO UND IN VIVO ERGEBNISSE

Aufgabe und Ziel dieses Abschnittes war die Untersuchung der in Abschnitt 2 optimierten Liposomen hinsichtlich ihrer Eignung als wirksame Träger von Chemotherapeutika für eine Antitumorthherapie.

Um die Liposomen beurteilen zu können, wurden sie bezüglich ihrer Größe, ihres Vermögens, Doxorubizin effizient zu verpacken und ihrer Plasmastabilität *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es folgte die Betrachtung ihres toxischen Potentials sowie ihres Vermögens, das Doxorubizin im Tumor unter Verringerung von Nebenwirkungen anzureichern und eine Verzögerung des Tumorwachstums unter Verlängerung der Überlebensdauer im murinen Tiermodell zu erreichen.

Alle verwendeten Liposomenformulierungen zeigten nach ihrer Beladung ein nur geringes Wachstum von maximal etwa 10 nm auf maximal etwa 100 nm (s. Abschnitt 3.2.2.2.), so dass zu erwarten war, dass die Liposomen - auch nach Beladung mit Doxorubizin - in Bereichen fenestrierten Endothels wie in Leber und Milz sowie in Bereichen erhöhter vaskulärer Permeabilität - insbesondere im Tumor - akkumulieren können. Ihre für die medizinische Anwendung und Wirksamkeit wichtige morphologische Integrität konnte indes anhand der kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden (s. Abschnitt 3.2.2.3.) und auch pharmazeutisch wichtige Stabilitäts-untersuchungen bezüglich der beabsichtigten Langzeitlagerung ergaben Werte, die eine solche Anwendung ermöglichen (s. Abschnitt 3.2.2.4.).

Um mit den Liposomen eine möglichst hohe Konzentration von Doxorubizin im Tumor zu erreichen, wurde das Lipid:Doxorubizin-Verhältnis von 1:5 gewählt. Die Verpackungseffizienz für die AVE9 lag hier bei 80-90 % - je nach Cholesterolgehalt in der Lipidmembran. Im Vergleich hierzu betrug die Verpackungseffizienz von Doxorubizin im Falle der AVE3 nur etwa 40 %. Die deutlich längere Plasmaverweildauer der AVE9 gegenüber den AVE3 (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.4.1.1. und 2.2.4.1.3.) war der ausschlaggebende Grund für die Wahl dieser Formulierung bei den nachfolgenden pharmakodynamischen Versuchen (s. Abb. 3.2. und 3.3.). Die Beladungseffizienz der AVE9 konnte zudem durch die Anpassung der Dauer der Beladungsphase während des *Remote Loading* auf nahezu 100 % optimiert werden (s. Abb. 3.1.).

Zwar konnte im Folgenden gezeigt werden, dass mit AVE3 DOX inkubierte Tumorzellen im Vergleich zu mit AVE9 DOX inkubierten Tumorzellen eine stärkere Fluoreszenz der Zellen und somit eine höhere Aufnahme des Doxorubizins zeigten (s. Abschnitt 3.2.3.2.), diese Untersuchungen sind jedoch im Kontext eines raschen Integritätsverlustes der AVE3 DOX nach Kontakt mit humanem Plasma sehr kritisch zu betrachten (s. Abb. 3.20.). Eine stärkere Fluoreszenz infolge des frühzeitig freigesetzten Doxorubizins, das leicht die Zellmembran permeiert (Lasic *et al.*, 1995) ist hier nicht auszuschließen. Dennoch sind auch unspezifische Wechselwirkungen zwischen der im Vergleich zu der AVE9-Lipidmembran stärker negativ geladenen AVE3-Lipidmembran und der Zelloberfläche nicht auszuschließen. Auch PS-vermittelte Aufnahmeprozesse sowie mittelbare Mechanismen über die starke Bindung von Serum- und Plasmaproteinen (s. Abschnitt 2.2.3.3.), welche ihrerseits wieder spezifisch oder unspezifisch mit der Zelloberfläche wechselwirken, könnten die stärkere Aufnahme des Doxorubizins nach Inkubation mit AVE3 *in vitro* erklären.

Da die AVE9 DOX, insbesondere nach kurzer Inkubationsdauer, trotz ihrer geringeren Aufnahme in die Zellen eine höhere toxische Wirkung auf alle untersuchten Zellen haben als die AVE3 DOX, liegt die Vermutung von

sekundären Effekten über Wechselwirkungen des Doxorubizins mit zellulären Proteinen und Lipiden nach Aufnahme der AVE9-Liposomen in die Zellen nahe (s. Tabelle 3.1.), die bei Diffusion des freien oder frühzeitig aus den AVE3 DOX freigesetzten Doxorubizins in die Zellen so nicht auftreten (s. Abschnitt 3.2.3.3.). Auch eine langsamere Aufnahme der AVE9 DOX mit einer kontrollierteren Freisetzung, was eine höhere Toxizität zur Folge hätte, wäre denkbar.

Der Frage nach der optimalen Konzentration von Cholesterol in der Lipidmembran der AVE9 (AVE9 35%Chol DOX versus AVE9 50%Chol DOX) wurde im weiteren Verlauf *in vivo* nachgegangen, da die *in vitro* durchgeführten Plasmastabilitätsuntersuchungen keinen Unterschied zeigten: Für beide AVE9-Formulierungen ergab sich nach Plasmainkubation über Nacht ein Plateau des verpackten Doxorubizins von etwa 40 % (gegenüber nur etwa 25 % bei AVE3 DOX) unabhängig von der verwendeten Cholesterolkonzentration (s. Abb. 3.22.). Zudem unterschieden sich die AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX nicht hinsichtlich ihrer Aufnahme in kultivierte Zellen (s. Abb. 3.11.).

Für die Wirksamkeit liposomaler Chemotherapeutika spielen zwei diskrepante Eigenschaften der Liposomen eine unabdingbare Rolle: Zum einen müssen die Liposomen den Inhaltsstoff effizient und stabil in ihrem Innern verpacken und dürfen ihn auch nach Kontakt mit den Proteinen und Zellen des Blutes nicht freigeben, um seine Anreicherung nach Akkumulation der Liposomen im Tumor zu ermöglichen (Gabizon, 1988). Zum anderen muss jedoch gleichermaßen eine hohe Bioverfügbarkeit des verpackten Chemotherapeutikums am Tumor gewährleistet sein, damit es dort seine Wirkung entfalten kann (Mayer *et al.*, 1998). Die von Paul Ehrlich abstrahierte *magic bullet* besitzt also ein optimales Verhältnis von Stabilität im Blut und Destabilisierung im Tumorgewebe (Ehrlich, 1906).

Dem Abschnitt 3.2.4.1. ist zu entnehmen, dass die AVE3 DOX eine mit freiem Doxorubizin vergleichbare Elimination aus dem Blut aufweisen

(Plasmahalbwertszeiten von weniger als 45 Minuten), während AVE9 50%Chol DOX mit einer Plasmahalbwertszeit von über 120 Minuten deutlich länger im Blut verweilen. DOXIL® zirkuliert mit einer Plasmahalbwertszeit von über 500 Minuten deutlich länger als die übrigen Formulierungen und erfüllt damit also die Forderung nach langsamer Elimination aus dem Blut und hoher Stabilität des verpackten Doxorubizins am besten. Freies Doxorubizin wird besonders schnell aus dem Blut eliminiert und metabolisiert, bereits nach 6 Stunden sind die Konzentrationen in den Organen verglichen zu den liposomalen Formulierungen bis zu mehr als 10 mal niedriger. Tatsächlich kommt es nur im Falle der AVE9 50%Chol DOX sowie des DOXILs® zu einer Anreicherung des Doxorubizins im Tumor (s. Abb. 3.26.), nicht jedoch zu der typischen Akkumulation im Herzgewebe, wie sie für freies Doxorubizin häufig zu beobachten ist (s. Tab. 3.2. und Abb. 3.27.).

In den folgenden pharmakodynamischen Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses auf das Tumorwachstum sowie die Überlebensrate der Versuchstiere zeigte sich, dass alle untersuchten liposomalen Formulierungen einen besseren Therapieerfolg erzielten als freies Doxorubizin (s. Abschnitt 3.2.4.2.). Der geringe Unterschied in den Überlebensraten von freiem und liposomalem Doxorubizin (s. Abb. 3.31. und 3.33.), der in einem anderen Experiment jedoch deutlicher ausfiel (s. Abb. 3.29.) und z.B. auf einen unterschiedlichen Allgemeinzustand der Mäuse in den unterschiedlichen Experimenten hinweisen könnte, ist ein Indiz für die Notwendigkeit einer Wiederholung dieser Versuche.

Die AVE9 50%Chol DOX erwiesen sich hinsichtlich der Verzögerung des Tumorwachstums sowie der Verlängerung der Überlebenszeit als erfolgreicher als die AVE9 35%Chol DOX. Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund kürzerer Halbwertszeiten bei niedrigen Cholesterolkonzentrationen (s. Abb. 2.24.) sowie der bereits erwähnten ähnlichen Stabilität der AVE9 35%Chol DOX *in vitro*, jedoch schnelleren Elimination aus dem Blut *in vivo* abschließend nicht eindeutig zu beurteilen.

Insbesondere im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung des Einflusses des Sphingomyelins auf die Plasmaverweildauer (s. Abschnitt 2.2.4.1.7.) sowie die therapeutische Wirksamkeit (s. Abb. 3.32. und 3.33.) wird deutlich, dass die Stabilität der Liposomen im Blut für ihre Wirksamkeit von wichtiger Bedeutung ist. Die Kombination aus hohen Cholesterolanteilen in der Lipidmembran in Verbindung mit Sphingomyelin zur Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen führt also vermutlich über die Stabilisierung der Liposomenmembran zu einer erhöhten therapeutischen Wirksamkeit. Dass die Stabilität der Liposomen zwar einen wichtigen, aber nicht den einzigen Faktor darstellt, der für die therapeutische Wirksamkeit bedeutend ist, wird insbesondere aus den Abbildungen 3.34. und 3.35. in Verbindung mit den Abbildungen 3.24. und 3.26. deutlich: zwar zirkulieren die DOXIL®-Liposomen sehr lange im Blut und akkumulieren in der Folge im Tumor, dennoch bleibt ihre therapeutische Wirksamkeit deutlich hinter der von AVE9 50%Chol DOX zurück. Eine mögliche Erklärung kann die geringere Bioverfügbarkeit des Doxorubizins im Falle der DOXIL®-Liposomen sein.

3.3.2. AUSBLICK

Die AVE9 50%Chol DOX stellen hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften wie Größe und Lagerungsstabilität sowie ihrer physiologischen Eigenschaften wie Organverteilung, Blutelimination, Tumorakkumulation und therapeutischer Wirksamkeit des verpackten Chemotherapeutikums sorgfältig optimierte und neuartige Liposomen dar, die sich durch ihr optimales Verhältnis von Stabilität im Blut und Destabilisierung im Tumor auszeichnen.

Ob sich durch die Verwendung kurzkettiger und gesättigter Lipidmoleküle in der Liposomenmembran, wie sie in Abschnitt 2.2.4.1.6. zur Verlängerung

der Plasmaverweildauer der leeren AVE9 untersucht wurde, die therapeutische Wirkung weiter verbessern läßt, bleibt weiterhin Gegenstand der aktuellen Untersuchungen, ebenso wie die Verwendung tumor- und endothelzellspezifischer Liganden für eine Zielsteuerung der Doxorubizin-beladenen Liposomen zur Vermeidung von Nebenwirkungen. Insbesondere dem Verhältnis aus Stabilität im Blut und Destabilisierung im Tumor muss bei diesen Untersuchungen ein besonderes Augenmerk gewidmet werden.

Inwieweit eine Tumorendothelzell-spezifische Bindung der AVE9 50%Chol DOX für die bessere Wirksamkeit gegenüber DOXIL® verantwortlich ist, konnte abschließend nicht geklärt werden und sollte daher weiterhin im Blickfeld weiterer Untersuchungen bleiben.

Die genaue Untersuchung von Nebenwirkungen und maximal injizierbaren Dosen muss folgen, um eine optimale Therapie zu ermöglichen.

Die hier angestellten Untersuchungen hinsichtlich der Verwendung der AVE9 als wirksame Träger von Chemotherapeutika sollte auch für andere vielversprechende Substanzen zur Antitumorthherapie wie z.B. Mitoxantron wiederholt werden.

4. Optimierung von AVP (artificial virus-like particle)-basierten liposomalen Trägersystemen für eine Gentherapie von Tumorerkrankungen

4.1. EINLEITUNG

Chemotherapie versus Gentherapie, Vor- und Nachteile viraler und nichtviraler Gentransfersysteme, Strategien zur Optimierung nichtviraler Transduktion genetischen Materials in vivo, Entwicklung optimierter Transferrin-inkorporierender AVP-Komplexe

Limitierende Faktoren einer erfolgreichen chemotherapeutischen Behandlung - sei sie konventionell oder liposomal angewandt - sind zum einen die bereits dargestellten schwerwiegenden und daher dosislimitierenden Nebenwirkungen und zum anderen die Entwicklung von Resistenzen infolge der hohen Mutagenität der Tumore (Gomez-Navarro *et al.*, 1999; Agarwal und Kaye, 2003).

Die Gentherapie als ein neuartiger Ansatz für die Behandlung maligner Erkrankungen ist das Ergebnis eines umfassenden Erkenntnisgewinns bei der Erforschung molekularer Ursachen der Tumorentstehung (Hesketh, 1994; Giovanni *et al.*, 2000). Krebs entsteht demnach als Folge einer Ansammlung von sukzessiven Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Nowell, 1976; Marx, 1994a und 1994b; Shah und Schwartz, 2001). Während die Chemotherapie versucht, die Zellphysiologie durch Eingriffe in den Metabolismus oder die Proteinexpression zu verändern, behandelt die Gentherapie die Erkrankung ursächlich auf der molekularen Ebene der DNA durch funktionale Substitution oder Inaktivierung dysfunktionaler Gene (Morgan und Anderson, 1993; Mountain, 2000; Pandha *et al.*, 2000; McCormick, 2001). Hierdurch können Resistenzen gegen chemotherapeutische Wirkstoffe vermieden und die Nebenwirkungen, die durch die Schädigung gesunden Gewebes entstehen, deutlich reduziert werden (Ye *et al.*, 1998; Spack und Sorgi, 2001), zumal die Gentherapie durch die tumorspezifische Zielsteuerung der Gentransfervehikel - Vektoren

genannt - sowie die Verwendung tumor- und gewebsspezifischer Expressionskonstrukte eine stringente Spezifität und hohe Sicherheit ermöglicht (Harris und Lemoine, 1996; Peng, 1999; Nettelbeck *et al.*, 2000).

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche klinische Anwendung der Gentherapie *in vivo* ist der effiziente Transfer des genetischen Materials in das betroffene maligne Gewebe (Anklesaria, 2000). Die entwickelten Methoden für eine *in vitro* Transfektion von Zellen wie die Kalzium-Phosphat-Präzipitation (Graham und van der Eb, 1973), die Komplexierung der polyanionischen DNA mit kationischen Polymeren wie DEAE-Dextran (Ishikawa und Homcy, 1992) oder Polylysin (Zhou *et al.*, 1991) oder physikalische Methoden wie die Elektroporation (Chu *et al.*, 1987) oder die Mikroinjektion (Capecchi, 1980) sind für eine *in vivo* Anwendung nur sehr bedingt und kaum für eine systemische Anwendung geeignet.

Rekombinante Retro-, Adeno- oder Adeno-assoziierte Viren (Anderson, 1998, Günzburg und Salmons, 1995; Kay *et al.*, 2001; Lundstrom, 2003) sowie Vektoren auf der Grundlage von Lipiden (Tresco und Selden, 1995; Luo und Saltzman, 2000; Niidome und Huang, 2002) können diese und weitere Kriterien für eine *in vivo* Anwendung - nämlich eine sichere und für den Gesamtorganismus nichttoxische Anwendung bei spezifischem Gentransfer - erfüllen, wenngleich sowohl virale als auch nichtvirale Systeme zahlreiche Einschränkungen in ihrer erfolgreichen Anwendung besitzen.

Die schwierige Zielsteuerung von Retroviren (Zhao *et al.*, 1997), die mögliche Entstehung replikationskompetenter Adenoviren durch Rekombinationsereignisse *in vivo* sowie die unspezifische Integration von Adeno-assoziierten Viren in das Wirtsgenom (Verma und Somia, 1997) limitieren die wiederholte Anwendung viraler Vektoren gleichermaßen wie die Induktion zellulärer und humoraler Immunreaktionen gegen virale Proteine (Ali *et al.*, 1994).

Anders als virale Vektoren sind nichtvirale Gentransfersysteme wie nackte DNA (Wolff *et al.*, 1990), Liposomen-DNA-Komplexe (Lipoplexe) (Lee und Huang, 1997; Felgner *et al.*, 1987), Polymer-DNA-Komplexe (Polyplexe)

(Zauner *et al.*, 1999; Godbey *et al.*, 1999; Kukowska-Latallo *et al.*, 1996) oder Liposomen-Polymer-DNA-Komplexe (Lipopolyplexe) (Gao und Huang, 1996; Lee und Huang, 1996) (zur Nomenklatur siehe insbesondere: Felgner *et al.*, 1997) in der Größe der verpackten DNA sowie in der Anzahl der wiederholten Anwendungen nicht eingeschränkt (Lee und Huang, 1997; Liu *et al.*, 1995; Dass und Burton, 1999).

Die Nachteile in der Anwendung nichtviraler liposomaler Vektoren liegen in ihrer geringen Transfektionseffizienz unter physiologischen Bedingungen sowie der Zytotoxizität insbesondere kationischer Lipide und Polymere (Egilmez *et al.*, 1996; Kabanov, 1999; Templeton, 2002).

Zu den extrazellulären systemischen Barrieren, die einer erfolgreichen nichtviralen Transduktion genetischen Materials entgegenstehen, zählt die Adsorption von Plasmaproteinen, wie z.B. Lipoproteinen, α - und β -Globulinen sowie Albumin (Dass und Burton, 1999), die zum einen zur Destabilisierung der Komplexe mit anschließender Degradation der DNA durch Serumnukleasen (Mahato *et al.*, 1995; Harvie *et al.*, 1998) und zum anderen zur Aggregation der Komplexe und anschließenden Embolisierung im Lungenkapillarsystem führt (Nishikawa und Huang, 2001). Insbesondere die Opsonisierung durch Komplementfaktoren und Immunglobuline (Plank *et al.*, 1996) führt zu einer raschen Elimination der Komplexe durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems (Litzinger *et al.*, 1996, Juliano, 1989; Brown *et al.*, 2001).

Zu den intrazellulären Barrieren zählt die Notwendigkeit der spezifischen Bindung an die Zielzellen und die Aufnahme durch Membranfusion oder Endozytose (Schätzlein und Uchegbu, 2001) sowie die anschließende Freisetzung der DNA aus dem endosomalen Kompartiment (El Ouahabi *et al.*, 1997; Bally *et al.*, 1999). Weiterhin hängt die erfolgreiche Transduktion vom nukleären Transport der DNA ab (Vacik *et al.*, 1999).

Strategien zur Optimierung der Gentransfereffizienz nichtviraler Systeme *in vivo* zielen daher zum einen auf eine Reduzierung der unspezifischen Adsorption von Plasmaproteinen durch den Einbau hydrophiler Gruppen wie des Polyethylenglycols zur Abschirmung der Komplexe (Collard *et al.*,

2000; Monck *et al.*, 2000), zum anderen auf eine Erhöhung der Zielzellspezifität der Vektoren durch den Einbau spezifischer Liganden wie z.B. Transferrin (Cheng, 1996), Folat (Wang und Low, 1998) oder RGD-Peptiden (Pasqualini *et al.*, 1995, 1997; Kolonin *et al.*, 2001). Fusionsproteine mit viralen Kernlokalisationssequenzen (Branden *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2000) sowie Konsensussequenzen in der transduzierten Plasmid-DNA selbst, welche zielzellspezifische Transkriptionsfaktoren mit entsprechenden Kernlokalisationssequenzen rekrutieren (Dean, 1997, Vacik *et al.*, 1999), können zudem den nukleären Transport vermitteln.

Ergebnis einer solchen Optimierung ist das bereits im Jahre 2001 beschriebene liposomale AVP-Gentransfersystem (Müller *et al.*, 2001; Fahr *et al.*, 2002), welches durch die Verwendung anionischer statt kationischer Lipide die Interaktion mit negativ geladenen Plasmabestandteilen reduziert (Müller, 2000, S. 106-108). Polyethylenimin (PEI) als verwendetes DNA-Kondensationsreagenz erleichtert zudem den zytosolischen Transport, indem es als lysoosmotropisches Agens die endosomale Azidifizierung verhindert (Godbey *et al.*, 1999; Behr, 1997). Durch den Einbau eines Integrin $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen RGD-Liganden sowie die Verwendung eines gewebespezifischen Promotorkonstrukts konnte zudem eine hohe Spezifität für Endothelzellen (Müller *et al.*, 2001) und Melanomzellen (Nahde *et al.*, 2001) erreicht werden, wenngleich sich insbesondere Lungen-, Prostata- und Chorionkarzinomzellen, die sich durch eine niedrige Expression des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors auszeichneten, durch das AVP-System nicht effizient transduzieren ließen (Nahde, 2000).

Da insbesondere Lungen- und Prostatakarzinome für mehr als 30 % aller Krebsneuerkrankungen und für über 40 % aller tödlichen Verläufe von malignen Erkrankungen verantwortlich sind (American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2003) sollte in dem folgenden Abschnitt die Effizienz des AVP-Transfersystems weiter optimiert und die Zielzellspezifität für diese Tumorarten entsprechend modifiziert werden.

Der Transferrin-Rezeptor, der aufgrund seiner hohen Expression auf sich schnell teilenden malignen Zellen (Trowbridge und Domingo, 1981; Citores *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002) ein attraktiver Kandidat für die Zielsteuerung nichtviraler Gentransfersysteme ist (Wagner *et al.*, 1994; Ponka und Lok, 1999, Xu *et al.*, 1999a, Kircheis *et al.*, 2001; Tros de Ilarduya *et al.*, 2002), vermittelt in einem der am besten verstandenen Prozesse der Zellbiologie die zelluläre Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen (Li *et al.*, 2002; Qian und Lang, 1995; Morgan und Appleton, 1969; Sun *et al.*, 1999): Die Rezeptor-vermittelte Endozytose beginnt mit der Bindung von Holo-Transferrin mit zwei gebundenen Fe^{3+} -Ionen an den Transferrin-Rezeptor (May und Williams, 1980) mit anschließender Aufnahme in das endosomale Kompartiment durch die Ausbildung Clathrin-vernetzter Vesikel. Die Azidifizierung im späten endosomalen Kompartiment führt zur Dissoziation des Eisens vom Transferrin - das in diesem Zustand als Apo-Transferrin bezeichnet wird - sowie zum zytosolischen Transport des Eisens mittels des divalenten Metalltransporters DMT1 (Andrews, 1999). Eine konkurrierende Bindung von Holo- und Apo-Transferrin an den Transferrin-Rezeptor bei physiologischem pH von 7,4 findet nicht statt. Die Bindungskonstante von diferrischem Holo-Transferrin beträgt $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$, die von Apo-Transferrin hingegen etwa $5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ an Kaninchenerythrocyten (Young *et al.*, 1984; Qian und Tang, 1995).

Durch den nichtkovalenten Einbau von Transferrin in kationische Lipoplexe konnten *in vitro* Transfektionsraten von bis zu 100 % erreicht werden (Cheng, 1996; Simoes *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1997) und auch *in vivo* konnte für Transferrin-Lipoplexe ein effizienter systemischer Gentransfer gezeigt werden (Xu *et al.*, 1999a; Xu *et al.*, 1999b; Xu *et al.*, 2001). Die Erhöhung der Transduktionseffizienz durch die Inkorporation in Gentransferkomplexe *in vivo* beruht im wesentlichen auf drei Mechanismen: Durch die hydrophilen Gruppen im nahezu ungeladenen und nur leicht negativen Transferrin wird die Ladung der entstehenden Komplexe, die eine unspezifische Wechselwirkung mit Plasmaproteinen induzieren, abgeschirmt (*shielding*) (Kircheis *et al.*, 2001; Simoes *et al.*, 1998; Kono *et al.*, 2001). Die Zielsteuerung

der Transferrin-Komplexe in Richtung des Transferrin-Rezeptors mit anschließender Rezeptor-vermittelter Endozytose erhöht zudem die Spezifität für die Tumorzellen und die Aufnahme der Komplexe (*targeting*) (Wagner *et al.*, 1994; Tros de Ilarduya und Düzgünes, 2000). Zudem wird eine Transferrin-vermittelte Freisetzung aus den azidifizierten Endosomen diskutiert (*endosomal escape*) (Hueber und Finch, 1984; Aisen, 1994; Cheng, 1996; Simoes *et al.*, 1999). Durch den zusätzlichen Einbau von Protaminsulfat konnten die Polyplexe aus kationischen Lipiden weiter optimiert werden (Tros de Ilarduya *et al.*, 2002), da das polykationische Protaminsulfat (McKay *et al.*, 1986) im Gegensatz zu anderen kationischen Polymeren wie Polylysin die Kondensation der DNA potenzieren und ihre nukleäre Translokation induzieren kann (*nuclear entry*) (Sorgi *et al.*, 1997; Gao und Huang, 1996; Chan und Jans, 1999; Wagner *et al.*, 1990; Zenke *et al.*, 1990).

Für die beschriebenen ternären Komplexe aus kationischen Lipiden, DNA und Transferrin (Simoes *et al.*, 1998; Simoes *et al.*, 1999) sowie deren optimierte Lipoplexformen mit Protaminsulfat (Tros de Ilarduya *et al.*, 2002) konnte jedoch der zuvor postulierte spezifische Zielsteuerungsmechanismus des Transferrins nicht bestätigt werden, da eine vermeintliche Zielsteuerung auch mittels Apo-Transferrin möglich war. In diesen Fällen konnte gezeigt werden, dass die unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen des Transferrins mit den kationischen Lipiden in einem Verlust der Zielzellspezifität der Lipoplexe resultierten, während für ihre erhöhte Transduktionseffizienz insbesondere die Transferrin-vermittelte Freisetzung aus den Endosomen verantwortlich war (Simoes *et al.*, 1999).

Durch den Einbau von Transferrin und Protaminsulfat in das AVP-Gentransfersystem konnte eine deutliche Erhöhung der Zielzellspezifität gegenüber den nicht Transferrin-inkorporierenden AVP-Lipopolyplexen bei hoher Transferrin-vermittelter Zielzellspezifität erreicht werden. Auch konnte hierdurch eine deutliche Reduzierung der Interaktion mit humanen Plasmakomponenten erreicht werden.

4.2. ERGEBNISSE

Untersuchung und Optimierung von zielzellgesteuerten AVP-Transfektionskomplexen für Transferrinrezeptor-exprimierende Tumore

4.2.1. ÜBERBLICK

Vorgehensweise bei der Untersuchung und Optimierung von zielzellgesteuerten AVP-Transfektionskomplexen für Tumore, die den Transferrin-Rezeptor exprimieren

Bereits im Jahre 2000 wurden die AVP3 als hocheffiziente und nichttoxische Transfektionskomplexe beschrieben und charakterisiert (Müller, 2000). Hierbei handelt es sich um Lipopolyplexe auf der Grundlage der bereits zuvor beschriebenen AVE3-Formulierung (s. Abschnitt 2.2.1.). Als Kondensationsreagenz für die polyanionische Plasmid-DNA wurde niedrigmolekulares Polyethylenimin (PEI) verwendet, welches mit der DNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen kompakte Partikel ausbildet und sie vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Kabanov und Kabanov, 1995; Boussif *et al.*, 1995). Da DNA/PEI-Kondensate aufgrund ihrer ungünstigen Biokompatibilität für eine *in vivo* Anwendung nicht unproblematisch sind (Ogris *et al.*, 1999), wurden sie mit der untoxischen liposomalen Hülle der AVE3 überzogen, um insbesondere Interaktionen der Komplexe mit Serumproteinen zu minimieren (Nahde, 2000). Zur Zielsteuerung der Liposomen wurde zudem ein an N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin konjugiertes RGD-Peptid in die Liposomenmembran eingebaut (Pasqualini *et al.*, 1995; Pasqualini *et al.*, 1999), wodurch eine Erhöhung der spezifischen Transfektionseffizienz der AVP3-RGD für Melanom- und Tumorendothelzellen erreicht werden konnte (Müller *et al.*, 2001; Nahde *et al.*, 2001).

Da sich insbesondere hochmaligne und metastasierende Lungen-, Prostata- und Chorionkarzinomzellen¹ mit den AVP3-RGD nicht effizient

¹ Lungenkarzinomzellen: A549

transfizieren ließen (s. Abbildung 4.1.), sollte versucht werden, die AVP-Komplexe hinsichtlich ihres Zielzelltropismus zu modifizieren, um eine effiziente Transfektion von diesen Tumorzelllinien zu ermöglichen.

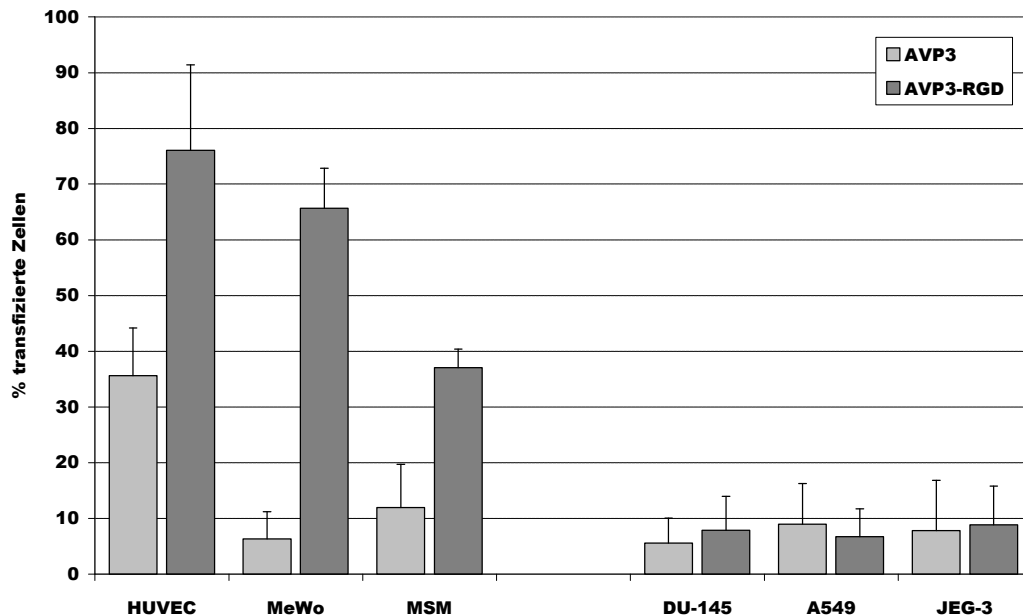


Abb. 4.1. FACS-Analyse von Zellen, die mit einem GFP-Plasmid transfiziert wurden (modifiziert nach Nahde, 2000)

Da in den vorherigen Abschnitten 2 und 3 die Überlegenheit der AVE9 gegenüber den AVE3 bei einer *in vivo* Anwendung gezeigt werden konnte, sollte zunächst das Potential entsprechender Transfektionskomplexe AVP9, Zellen *in vitro* zu transfizieren, untersucht werden. Auch die Möglichkeit, die AVP3 durch die Verwendung von Transferrin direkt zu modifizieren, wurde untersucht. Die anschließenden Ergebnisse zeigen die Optimierung und Charakterisierung der AVP3 im Falle der Verwendung von Protaminsulfat und Transferrin (AVP3^{opt-tf}). Die Untersuchungen bezüglich der Toxizität der optimierten Formulierungen und ihrer Stabilität sowie ihrer Wechselwirkungen mit Serumproteinen sollten erste Hinweise auf ein mögliches Verhalten bei einer *in vivo* Anwendung der Komplexe liefern (vgl. hierzu insbesondere Abschnitt 2.2.3.2. und 2.2.3.3.). Das Kapitel schließt ab mit einer Untersuchung der Spezifität der optimierten AVP3^{opt-tf}.

Prostatakarzinomzellen: DU145

Chorionkarzinomzellen: JEG3 (siehe hierzu auch Abschnitt 6.7.2.1.)

4.2.2. OPTIMIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON TRANSFERRIN-INKORPORIERENDEN AVP3-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN

Herstellung von AVP3-tf, Optimierung der AVP3 durch Einbau von Protaminsulfat und Transferrin zu AVP3^{opt}-tf und Charakterisierung der AVP3^{opt}-tf

4.2.2.1. AVP3 UND AVP9

Da in den Abschnitten 2.2.4.1.1. und 2.2.4.2 sowie 3.2.4.1. die Überlegenheit von AVE9, bzw. AVE9 DOX gegenüber den AVE3, bzw. AVE3 DOX gezeigt werden konnte, wurde zunächst untersucht, inwieweit sich AVP-Komplexe auf der Grundlage der AVE9-Formulierung für eine gentherapeutische DNA-Transduktion eignen würden.

Dazu wurden zunächst DNA/PEI-Partikel wie im Abschnitt 6.7.1.13. beschrieben hergestellt und mit den AVE9 zu den fertigen AVP9 komplexiert und mit den AVP3 und AVP3-RGD hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz in MeWo- und A549- Tumorzellen *in vitro* untersucht.

Die Abbildung 4.2. zeigt, dass sich mit den AVP9 Transfektionskomplexen nur sehr niedrige Transfektionsraten erzielen ließen, die für die MeWo-Zellen etwa 30-fach und für die A549-Zellen etwa 3-fach niedriger ausfielen als die Transfektionsraten der AVP3. Die Abbildung zeigt zudem die hohe Effizienz der AVP3-RGD in MeWo, die sich bei A549 hingegen nicht erreichen ließ.

Da die AVP9 in den untersuchten Zellen eine nur sehr niedrige Transfektionseffizienz aufwiesen, sollte im folgenden versucht werden, die AVP3 für eine *in vivo* Anwendung zu optimieren.

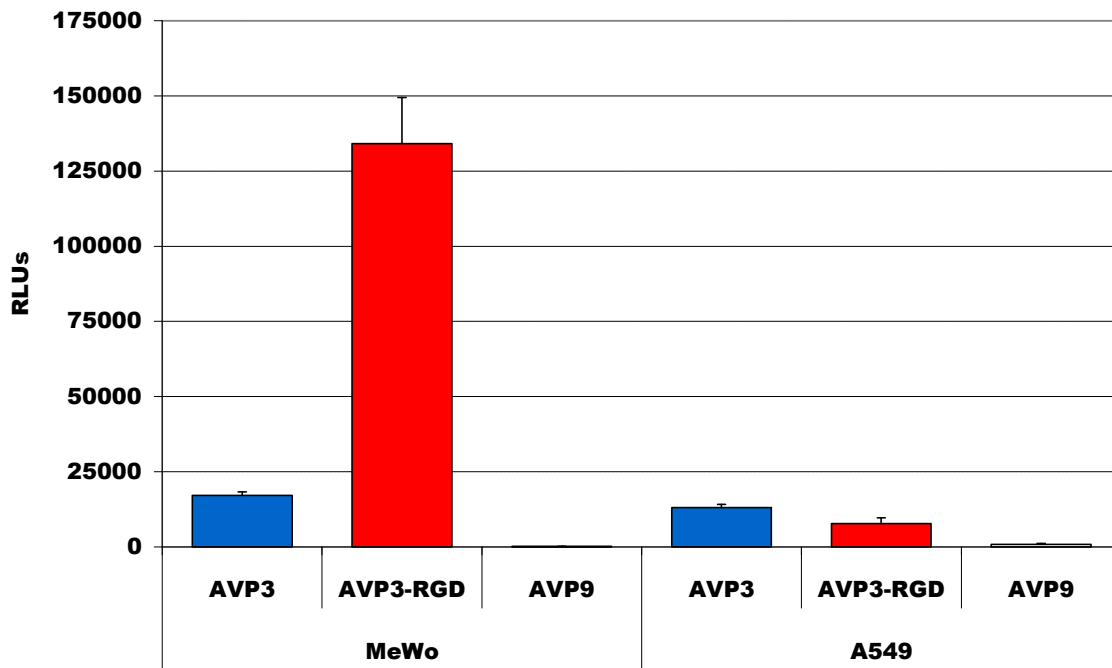


Abb. 4.2. Luziferaseaktivität nach Transfektion mit AVP3, AVP3-RGD und AVP9 in MeWo- und A549-Zellen

(zu den experimentellen Details siehe Abschnitt 6.7.1.13. und 6.7.2.4.)

4.2.2.2. AVP3-TF

Um die AVP3 hinsichtlich ihrer Zielzellspezifität für Lungen-, Prostata- und Chorionkarzinomzellen zu modulieren und als einen durch Austausch der Oberflächenliganden universell einsetzbaren nichtviralen Vektor zu optimieren, wurde zunächst versucht, Transferrin als Oberflächenliganden in die AVP3-Komplexe zu inkorporieren (s. Abschnitt 6.7.1.13.).

Der Transferrin-Rezeptor, der die Transferrin-vermittelte Aufnahme von Eisen in die Zellen vermittelt und der auf sich schnell teilenden malignen Zellen in hohem Maße exprimiert wird, wird via Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen und kann derart die Bindung und Aufnahme von Transferrin-inkorporierenden Transfektionskomplexen vermitteln (Simoes *et al.*, 1998). Da eisengesättigtes Holo-Transferrin (tf-holo) eine deutlich kleinere Bindungskonstante besitzt als Apo-Transferrin (tf-apo), welches kein Eisen

gebunden hat, muss eine Transferrin-vermittelte Erhöhung der Transfektionseffizienz spezifisch für Holo-Transferrin sein.

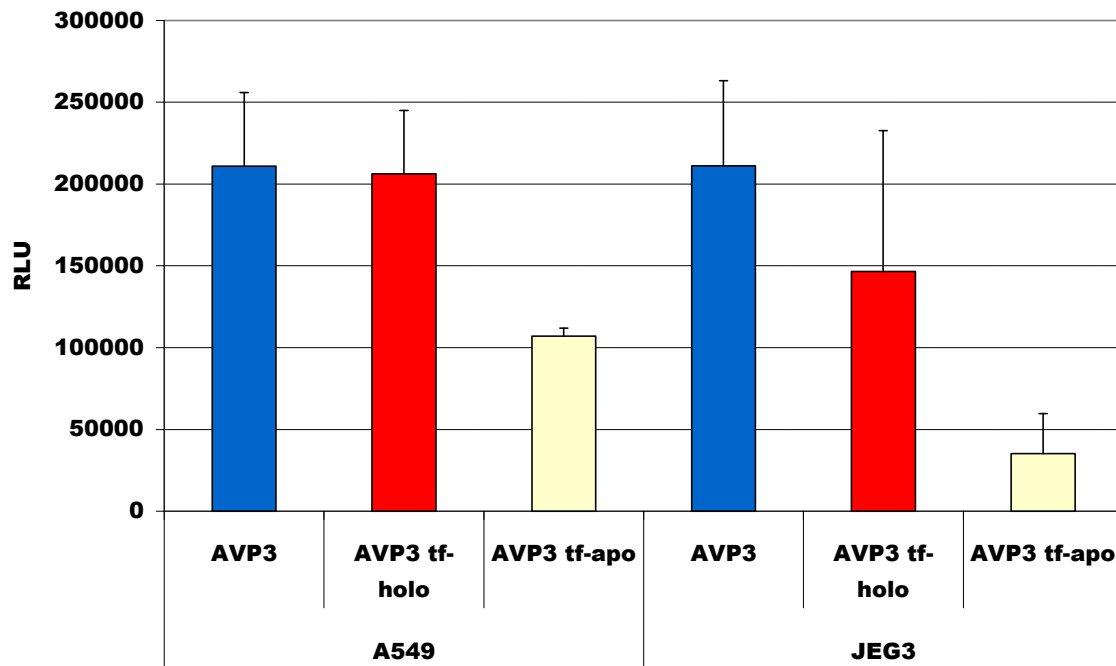


Abb. 4.3. Luziferaseaktivität nach Transfektion mit AVP3, AVP3-tf-holo und AVP3-tf-apo in A549- und JEG3-Zellen

Weder in A549- noch in JEG3 Zellen konnte durch die einfache Inkorporation von Transferrin in die AVP3 eine Verbesserung der Transfektionseffizienz erreicht werden, wenngleich die Holo-Transferrin inkorporierenden AVP3 eine etwa 2 fach höhere Luziferaseaktivität in den untersuchten Zellen zeigten als die AVP3-tf-apo (s. Abbildung 4.3.)

4.2.2.2. ENTWICKLUNG DER OPTIMIERTEN AVP3^{OPT-TF}

Da durch eine einfache Inkorporation des Transferrins in die AVP3 der gewünschte Effekt einer erhöhten und spezifischen Transfektionseffizienz nicht erreicht wurde, mussten die AVP3 zunächst für eine solche Transferrin-Inkorporation optimiert werden. Das kationische Protaminsulfat (PrS) kann in einem ersten Schritt Transferrin präkomplexieren und mit Lipoplexen aus kationischen Lipiden und DNA stabile Partikel bilden (Ilarduya *et al.*, 2002).

Da die ternären AVP-Lipopolyplexe bereits aus mit PEI kondensierter DNA und anionischen Liposomen bestehen, gibt es für die Herstellung solcher quartären PrS-AVP-tf-Partikel unterschiedliche Möglichkeiten, je nachdem an welcher Stelle des AVP-Herstellungsprozesses der Protaminsulfat-Transferrin-Präkomplex hinzugegeben wird, also vor oder nach Komplexierung der DNA durch PEI oder nach der Zugabe der AVE-Liposomen zum DNA/PEI-Komplex. Daher wurden in einem ersten Optimierungsschritt die Reihenfolge der Herstellungsschritte und die Menge an Protaminsulfat variiert, während die Transferrin-Menge konstant gehalten wurde. In einem zweiten Optimierungsschritt wurde die Transferrin- und Protaminsulfatmenge bei gleich bleibender Herstellung verändert (s. Abschnitt 6.7.1.13.).

Der Abbildung 4.4. ist zu entnehmen, dass mit der Zugabe von Protaminsulfat allein, egal in welcher untersuchten Menge, keine eindeutige Verbesserung der Transfektionseffizienz zu erreichen war. Erst die Zugabe des Protaminsulfat-Transferrin-Präkomplexes zeigte eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz, nur im Falle der Zugabe zu den fertigen AVP3 bei 2 µg Protaminsulfat blieb dieser Effekt aus. Sowohl bei 2 µg und 20 µg Protaminsulfat zur Vorkomplexierung des Transferrins zeigte sich der stärkste Effekt bei einer Zugabe zu dem DNA/PEI-Komplex vor der Zugabe der AVE3-Vesikel. Ferner verdeutlicht die Abbildung, dass der verstärkende Einfluss des Transferrins je nach Zugabezeitpunkt nicht nur für das Holo- sondern auch für das Apo-Transferrin auftrat, hier jedoch in allen Fällen nur höchstens halb so deutlich.

Da nach Zugabe des Protaminsulfat-Transferrin-Präkomplexes zum DNA/PEI-Komplex vor Zugabe der AVE3-Liposomen die besten Ergebnisse hinsichtlich Transfektionseffizienz und Spezifität von Holo- gegenüber Apo-Transferrin erzielt wurden, wurde diese Herstellungsreihenfolge für die weiteren Optimierungsuntersuchungen beibehalten.

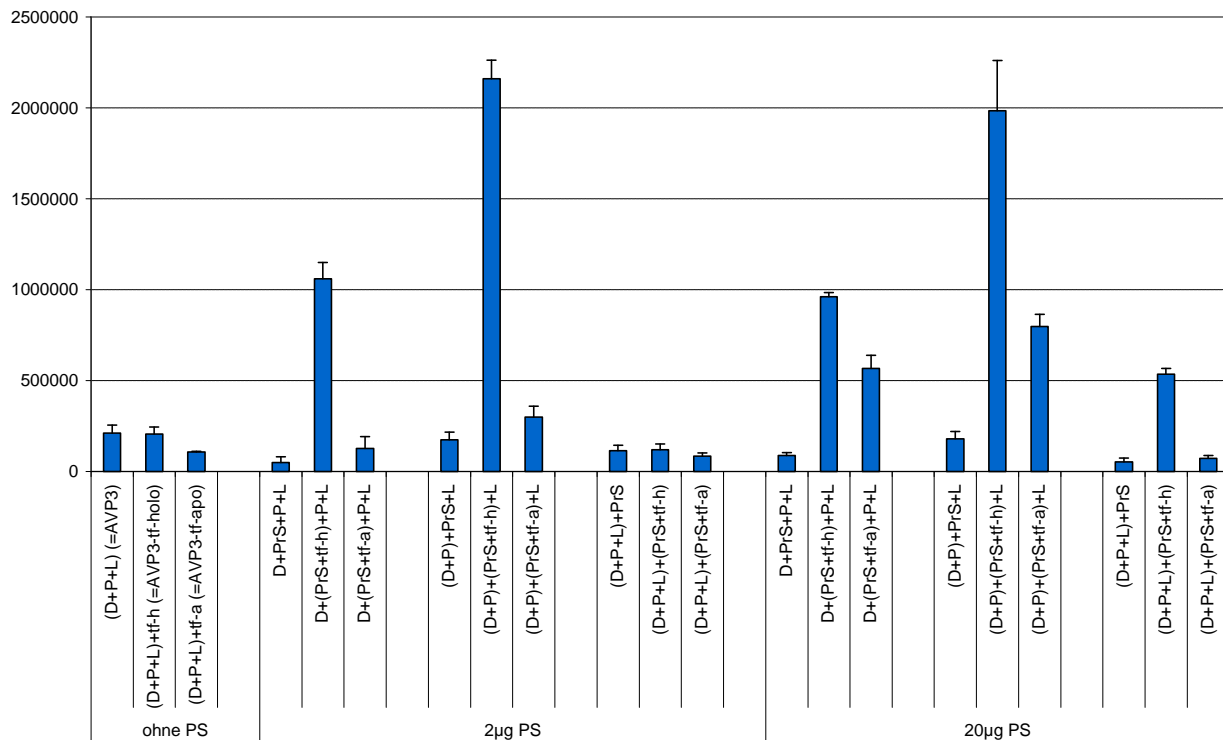


Abb. 4.4. Luziferaseaktivität nach Transfektion von A549 Zellen

Abkürzungen: D: DNA; P: PEI; L: Liposomen in Form von AVE3; tf-h: Holo-Transferrin; tf-a: Apo-Transferrin; PrS: Protaminsulfat; (PrS+tf): Protaminsulfat-Transferrin-Präkomplex; Die Klammern indizieren jeweils präkomplexierte Partikel; verwendete Transferrin-Menge: 25 µg

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Kombination an Protaminsulfat- und Holo-Transferrin-Mengen für die obige Herstellungsreihenfolge (DNA+PEI)+(PrS+tf)+L optimal sein würde. Die Abbildungen 4.5. und 4.6. zeigen, dass sich im Falle der A549-Zellen eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz erst ab 10 µg Holo-Transferrin zeigte, für JEG3-Zellen sogar erst ab 50 µg, die im Falle beider untersuchter Zelllinien bei einer Kombination von 2 µg Protaminsulfat und 50 µg Holo-Transferrin am höchsten war.

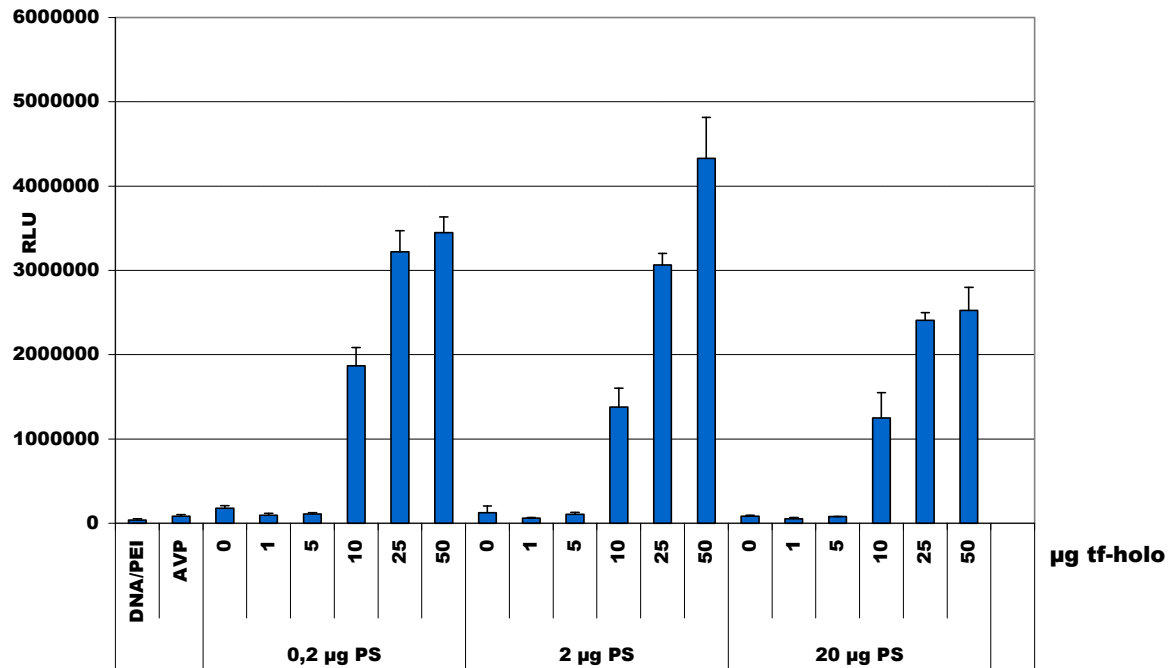


Abb. 4.5. Luziferaseaktivität nach Transfektion von A549-Zellen

Herstellungsreihenfolge: (DNA+PEI)+(PrS+tf-holo)+L

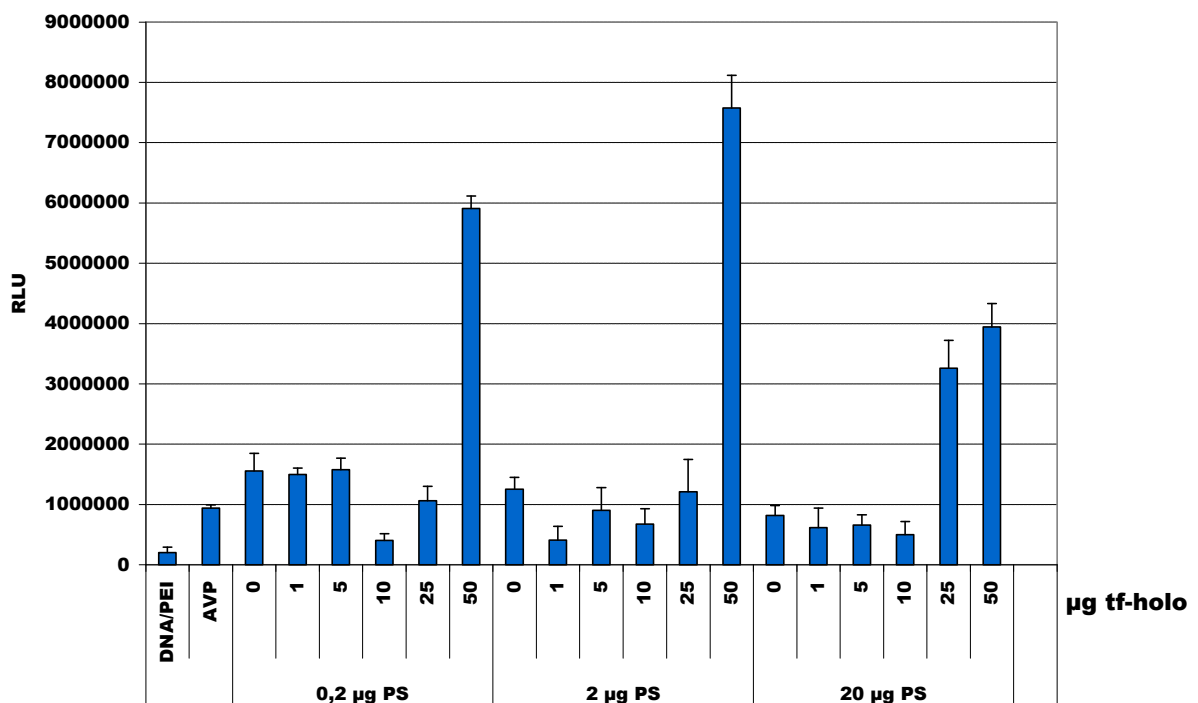


Abb. 4.6. Luziferaseaktivität nach Transfektion von JEG3-Zellen

Herstellungsreihenfolge: (DNA+PEI)+(PrS+tf-holo)+L

Die derart hinsichtlich Transfektionseffizienz und Spezifität gegenüber Apo-Transferrin optimierten und Transferrin-inkorporierenden AVP3-Komplexe werden im folgenden als AVP3^{opt-tf} bezeichnet. Sie enthalten 50 µg Holo-Transferrin sowie 2 µg Protaminsulfat und werden in der Reihenfolge (DNA+PEI)+(PrS+tf-holo)+L hergestellt.

4.2.2.3. CHARAKTERISIERUNG DER OPTIMIERTEN AVP3^{OPT-TF}

Größe und Toxizität der Transfektionskomplexe

Für die Untersuchung der Größen der Transfektionskomplexe wurden diese direkt nach der Herstellung sowie nach 24 Stunden mittels PCS vermessen (s. Abschnitt 6.7.4.7.). Für jede Formulierung wurden jeweils mindestens 3 Präparationen miteinander verglichen.

Hierbei entstanden für alle untersuchten Komplexe Partikel, deren Größe reproduzierbar deutlich unter 300 nm betrug (s. Abbildung 4.7.).

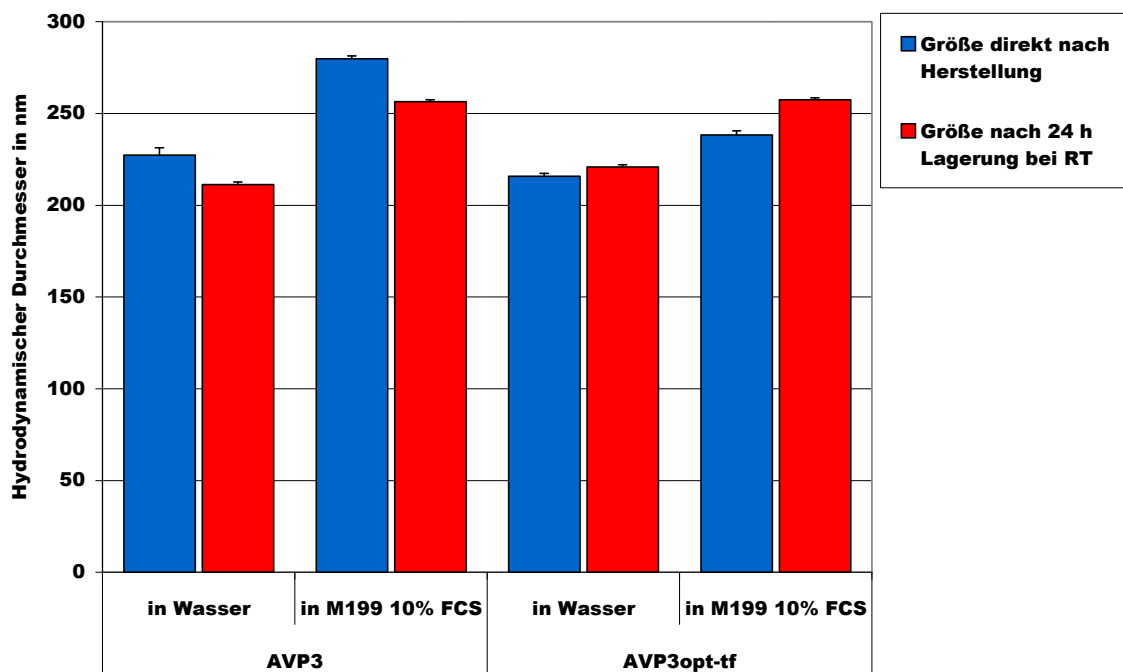


Abb. 4.7. Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (gemessen mittels PCS)

Die Polydispersitätsindizes waren bei allen untersuchten Formulierungen stets kleiner als 0,15. Für Details zum Transfektionsmedium s. Abschnitt 6.6. und 6.7.1.13.

Weder für die AVP3 noch für die optimierten AVP^{opt}-tf war eine deutliche Zunahme der Größe nach 24 h zu verzeichnen. Während für die AVP3 im Transfektionsmedium mit 10 % FCS eine deutliche Größenzunahme von etwa 220 nm auf etwa 280 nm zu erkennen war, blieben die AVP^{opt}-tf auch im Transfektionsmedium größenstabil und nahmen nur um etwa 20 nm an Größe zu.

Um die Toxizität der AVP^{opt}-tf im Vergleich zu anderen Transfektionsreagenzien und insbesondere zu AVP und den ursprünglichen AVP-RGD abschätzen zu können, wurden HUVEC-Zellen mit den verschiedenen Transfektionsansätzen für 6 Stunden inkubiert und anschließend wie im Abschnitt 6.7.2.10. beschrieben, untersucht. Der verwendete WST-Assay zeigt dabei die mitochondriale Aktivität gesunder Zellen durch eine Farbreaktion an, die durch Absorption bei 440 nm quantifiziert werden kann.

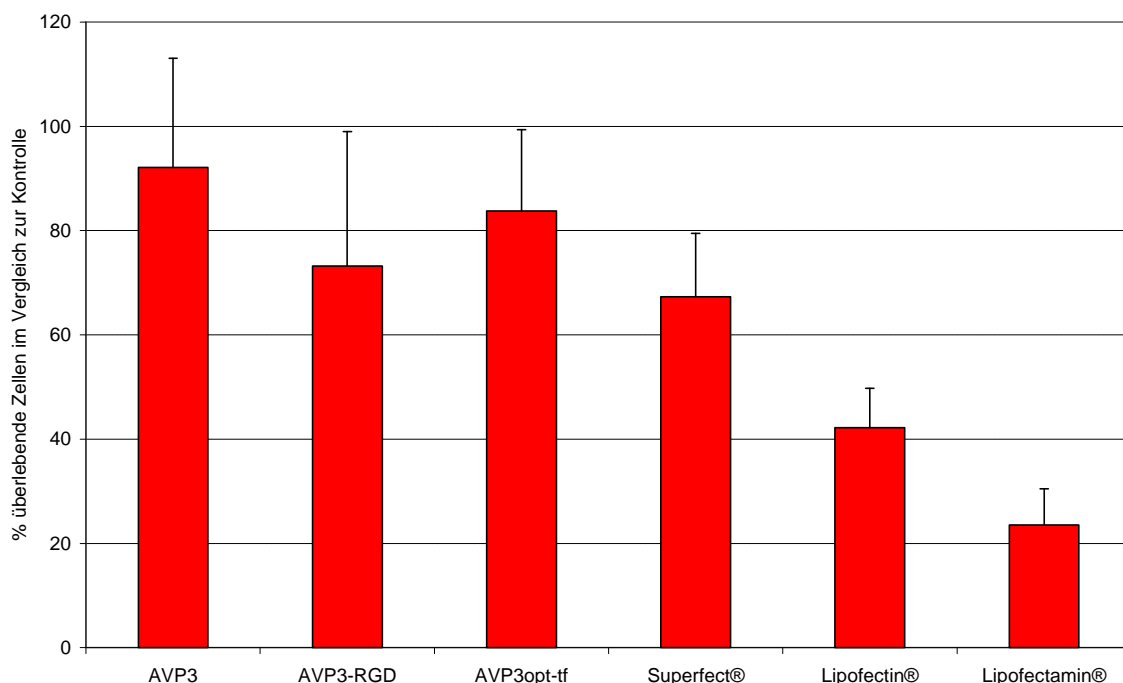


Abb. 4.8. Toxizität von AVP3, AVP3-RGD, AVP3^{opt}-tf, Superfect®, Lipofectin® und Lipofectamin® untersucht an humanen Umbilikalvenenzellen (HUVEC) nach 6 Stunden

Der Abbildung 4.8. ist deutlich zu entnehmen, dass insbesondere die AVP3 und AVP3^{opt-tf} nahezu ohne toxische Wirkung für die HUVEC bleiben, während speziell die Transfektionskomplexe aus den kationischen Lipiden Lipofectin® und Lipofectamin® bereits nach 6 Stunden eine deutlich toxische Wirkung zeigen. Die AVP-RGD sowie Superfect® nehmen hinsichtlich der Toxizität eine Mittelstellung ein.

4.2.2.3. INTERAKTION DER OPTIMIERTEN AVP3^{OPT-TF} MIT SERUMPROTEINEN

Einfluß des Serums auf die Transfektionseffizienz, Bindungsstudien und Komplementassay

Um den Einfluß des Serums auf die Transfektion mit AVP3 und AVP3^{opt-tf} zu untersuchen, wurden die Transfektionen in unterschiedlichen Medien mit jeweils hohem und niedrigem Gehalt an FCS (10 % und 2 %) durchgeführt. Wie der Abbildung 4.9. zu entnehmen ist, waren die AVP3^{opt-tf} - unabhängig vom verwendeten Medium - deutlich weniger serumabhängig als die AVP3, die sich in Medium mit einem niedrigen Gehalt an FCS als effizienter in der Transfektion erwiesen. Beide Formulierungen transfizierten in DMEM als Transfektionsmedium etwas besser.

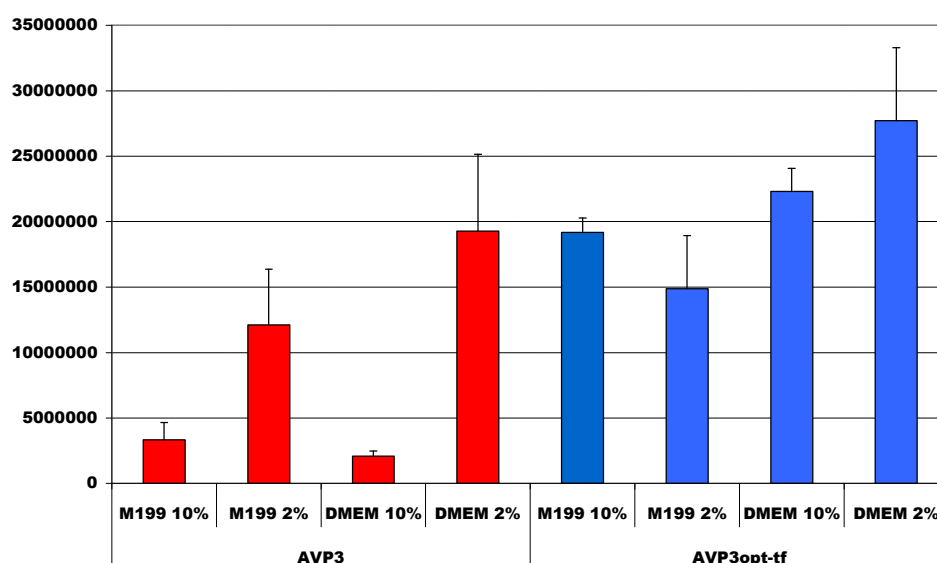


Abb. 4.9. Luziferaseaktivität nach Transfektion von JEG3-Zellen mit AVP3 und AVP3^{opt-tf} in verschiedenen Medien mit hohem oder niedrigem FCS-Gehalt

Die Interaktion der Transfektionskomplexe mit humanem Serum wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie untersucht (s. Abschnitt 6.7.1.18.). Dazu wurde humanes Plasma auf einer Sensoroberfläche immobilisiert, um die Wechselwirkungen mit vorbeiströmenden Transfektionskomplexen mittels gebrochenen Lichts analysieren zu können. Dabei resultieren starke Wechselwirkungen in einem starken Signal und schwache Signale entsprechend in einem schwachen Signal.

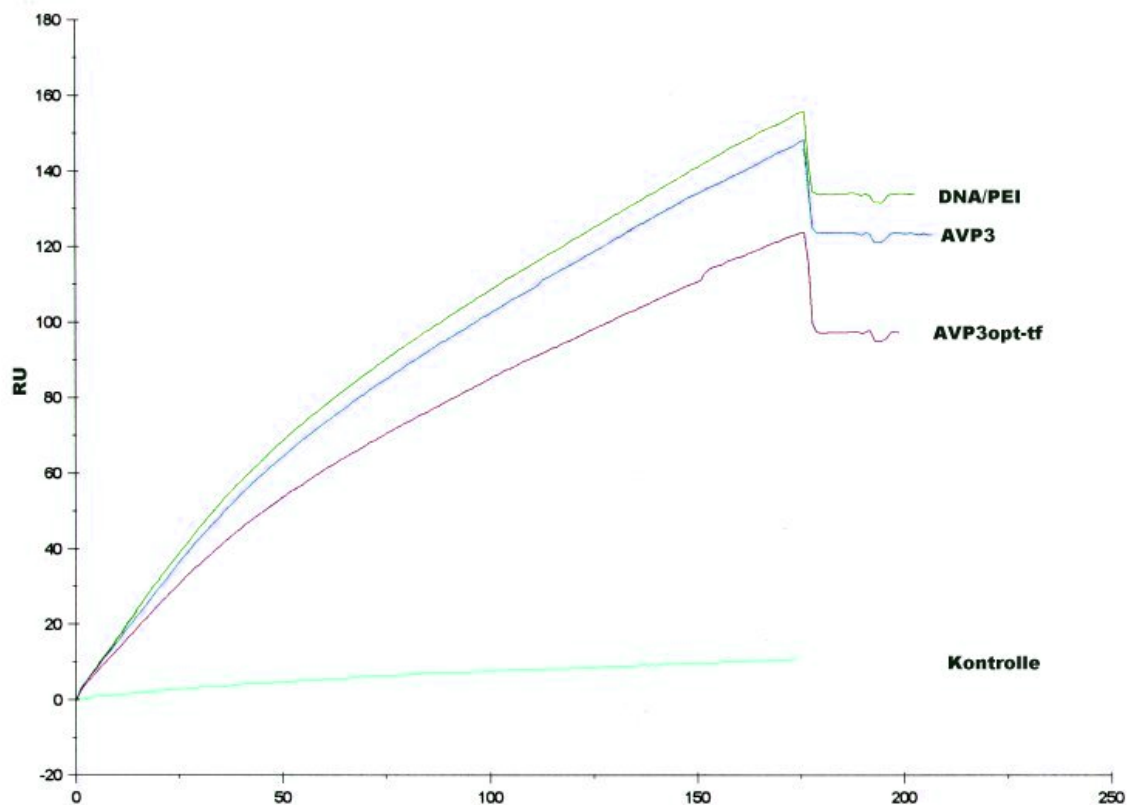


Abb. 4.10. Untersuchung der Serum-Transfektionskomplex-Wechselwirkungen mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Abbildung 4.10. zeigt, dass die DNA/PEI-Transfektionskomplexe die stärksten Wechselwirkungen mit humanem Serum eingingen. Die AVP3, die durch Zugabe der AVE3 zu solchen DNA/PEI-Transfektionskomplexen entstehen, zeigten bereits eine geringere Tendenz zur Wechselwirkung mit humanem Serum. Die optimierten AVP3^{opt-tf}-Komplexe zeigten hingegen eine deutlich niedrigere Wechselwirkung als alle anderen untersuchten Transfektionskomplexe.

Die Interaktion von DNA/PEI-, AVP3- sowie AVP3^{opt-tf}-Transfektionskomplexen mit humanen Komplementfaktoren wurde mit Hilfe eines gesamthämolytischen Komplementassays untersucht. Hierzu wurden die Komplexe in jeweils gleichen Mengen entsprechend 0,5 nmol bis 16 nmol Lipid mit humanem Serum inkubiert. Binden die Komplementfaktoren vollständig an die Liposomen, so kommt es zu keiner kreisförmigen Lyse um die Probe herum (vgl. hierzu insbesondere Abschnitt 2.2.3.2.).

Die Abbildung 4.11. zeigt, dass sowohl DNA/PEI- als auch AVP3-Transfektionskomplexe bei einer Konzentration von 16 nmol bis 4 nmol die Komplementfaktoren vollständig gebunden haben. Erst ab einer geringen Konzentration von 2 nmol kam es zu einer Lyse, da nicht mehr alle Komplementfaktoren abgefangen wurden. AVP3^{opt-tf} hingegen haben lediglich bei der hohen Konzentration von 16 nmol Lipid sämtliche Komplementfaktoren gebunden, bei allen niedrigeren Konzentrationen kam es zu einer deutlichen Lyse.

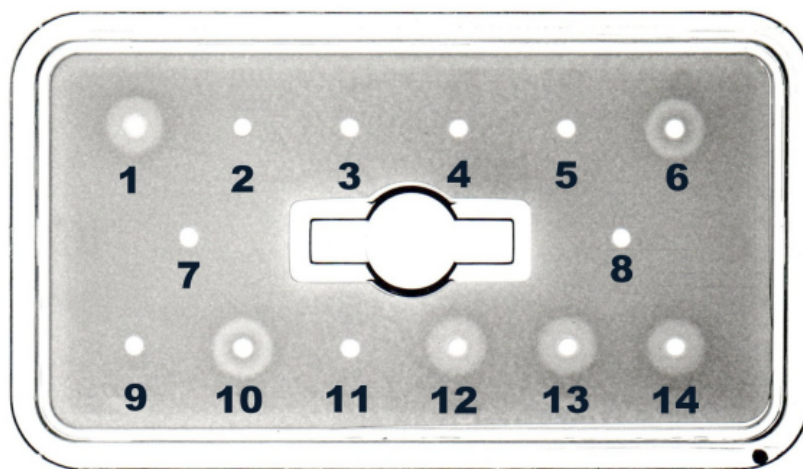


Abb. 4.11. Bindung von Komplementfaktoren an DNA/PEI-, AVP3- und AVP3^{opt-tf}

Die Abbildung zeigt eine gesamthämolytische Komplementplatte. Als Positivkontrolle (Probe 1) wurde hitzeinaktiviertes humanes Serum und als Negativkontrolle (Probe 2) humanes Serum aufgetragen. Die Proben 3-6 zeigen DNA/PEI-Transfektionskomplexe. Die Proben 7-10 zeigen AVP3. Die Proben 11-14 zeigen AVP3^{opt-tf}. Die Komplexe wurden jeweils mit humanem Serum inkubiert.

Je Komplex wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe aufgetragen (dies entspricht folgenden DNA- bzw. Lipid-Mengen: Probe 3: 2,5 µg DNA bis Probe 6: 0,3 µg DNA; Probe 7: 2,5 µg DNA/16 nmol Lipid bis Probe 10: 0,3 µg DNA/2 nmol Lipid; Probe 11: 2,5 µg DNA/16 nmol Lipid bis Probe 14: 0,3 µg DNA/2 nmol Lipid).

4.2.2.4. SPEZIFITÄT DER OPTIMIERTEN AVP3^{OPT}-TF MIT SERUMPROTEINEN

Zielzellspezifität von Holo-Transferrin, nicht jedoch Apo-Transferrin

Um die Spezifität der Transferrin-vermittelten Transfektionsverbesserung am Beispiel verschiedener Zellen untersuchen und besser beurteilen zu können, wurden verschiedene Tumorzelllinien zunächst hinsichtlich der Expression des Transferrin-Rezeptors untersucht (s. Abschnitt 6.7.2.5.).

Hierbei zeigten alle untersuchten Zelllinien eine starke Expression, mit Ausnahme der MSM-Melanomzellen, die den Rezeptor nur schwach exprimierten (s. Abbildung 4.12.).

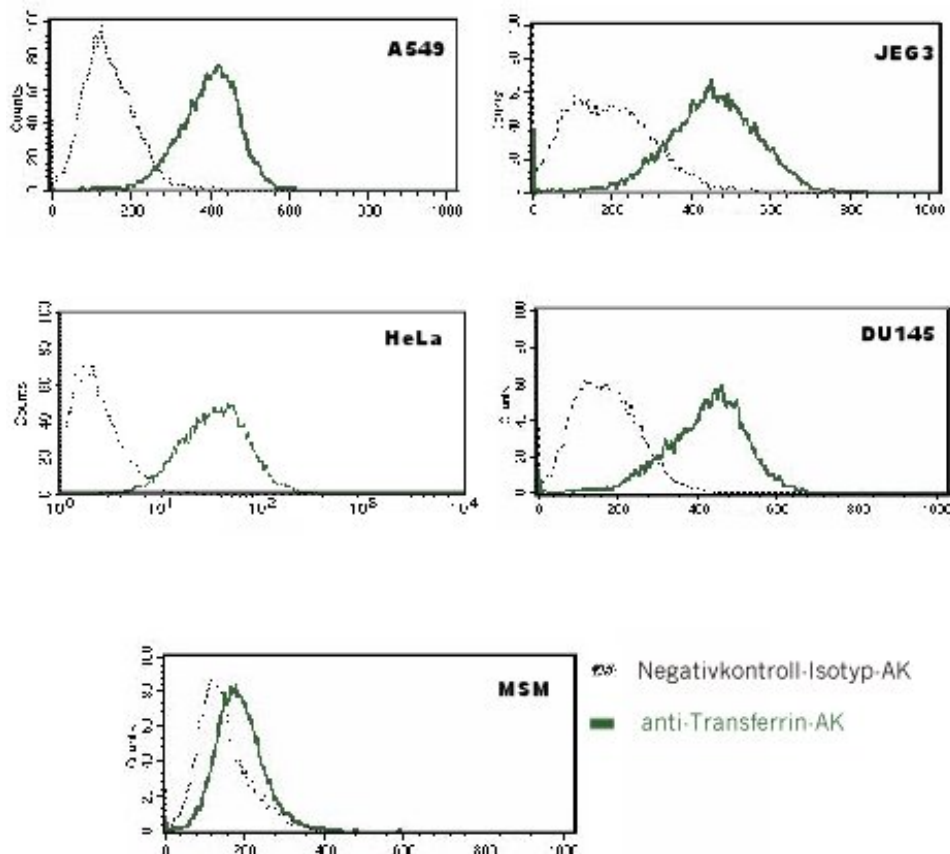


Abb. 4.12. FACS-Analyse der Integrinexpression verschiedener Tumorzelllinien

Die untersuchten Zelllinien wurden anschließend mit nicht Transferrin-inkorporierenden AVP3, nichtoptimierten AVP3-tf-holo, bzw. AVP3-tf-apo sowie optimierten AVP3^{opt}-tf-holo, bzw. AVP3^{opt}-tf-apo transfiziert.

Die Abbildung 4.13. verdeutlicht, dass ausschließlich mit optimierten AVP3^{opt}-tf-holo eine bis zu mehr als 10-fach stärkere Expression des Reporterkonstrukts in allen Zellen, die auch den Transferrin-Rezeptor exprimieren, erreicht werden konnte. Mit den optimierten AVP3^{opt}-tf-apo sowie in MSM-Zellen, die den Transferrin-Rezeptor nur schwach exprimieren blieb eine solche Transfektionsverstärkung aus.

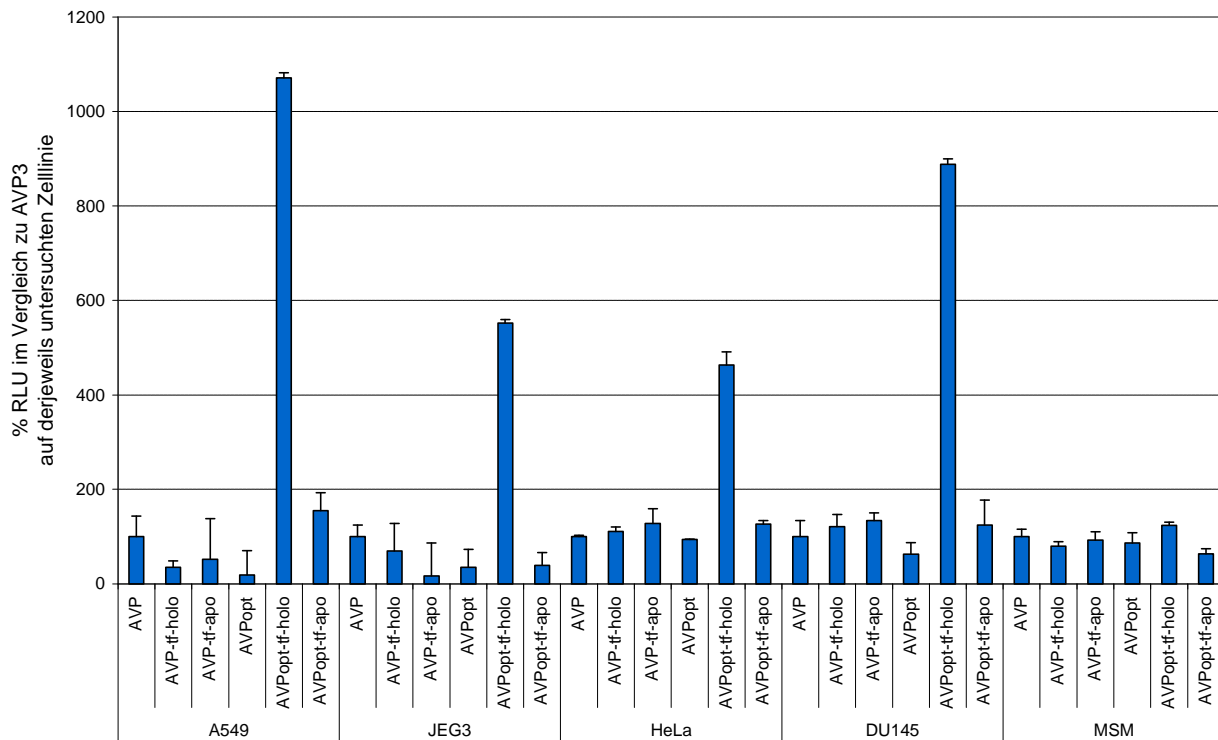


Abb. 4.13. Luziferaseaktivität nach Transfektion mit AVP3, AVP3-tf-holo, AVP3-tf-apo, AVP3^{opt}-tf-holo sowie AVP3^{opt}-tf-apo in Tumorzelllinien, die den Transferrin-Rezeptor stark (A549, JEG3, HeLa, DU145) oder schwach exprimieren (MSM)

4.3. DISKUSSION UND AUSBLICK

AVP3^{opt-ff} als optimierte Transfektionspartikel auf der Grundlage der AVP3 - spezifische Erhöhung der Transduktionseffizienz bei gleichzeitiger Abschirmung unspezifischer Wechselwirkungen mit Serumproteinen

4.3.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aufgabe und Ziel dieses abschließenden Ergebnisabschnittes war die Untersuchung und Optimierung von AVP3 (artificial virus-like particles)-basierten Transfektionskomplexen (Brüsselbach *et al.*, 2000; Schreier *et al.*, 1993) - für eine systemische gentherapeutische Antitumorthherapie, da sich diese bereits für die *in vitro* Transfektion von Endothelzellen (Müller *et al.*, 2001) und Melanomzellen (Nahde *et al.*, 2001) als hocheffiziente und nichttoxische Lipopolyplexe erwiesen haben. Da sich die AVP3 insbesondere für die Transduktion von Lungen-, Prostata- und Chorionkarzinomzellen als ineffizient erwiesen (s. Abbildung 4.1.), sollte diese Optimierung zudem auch auf die Modulation der Zielzellspezifität der AVP3 gerichtet sein. Bereits analysiert wurde die Zielzellspezifität als AVP3-RGD, welche mittels eines PE-gekoppelten zyklischen RGD-Peptids gegen den auf Endothel- und Melanomzellen überexprimierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor gerichtet ist. Da die genannten Karzinomzellen diesen Rezeptor nur schwach exprimieren, konnten die AVP3-RGD gegen sie bislang nicht zielgerichtet eingesetzt werden (Fahr *et al.*, 2002).

Die in den zuvor behandelten Abschnitten 2 und 3 für eine chemotherapeutische Anwendung optimierten AVE9 erwiesen sich als Liposomen für die Herstellung von AVP9-Transfektionskomplexen als nicht geeignet, da sich mit ihnen in den untersuchten Zellen nur eine bis zu 100-fach schwächere Expression des Reportergens erreichen ließ (Abb. 4.2.). Insbesondere das fehlende Phosphatidylserin in der AVE9-Lipidmembran kann hierfür verantwortlich sein, welches mittels einer PS-Rezeptor-vermittelten Endozytose der Komplexe (Greenspan und Gutman, 1994)

oder unspezifischer Wechselwirkungen mit Serumproteinen die Zellaufnahme fördern könnte (Pedroso de Lima *et al.*, 2003). Eine weitere Optimierung der AVP-Transfektionskomplexe durch Variation der verwendeten AVE-Liposomen in den Partikeln erfolgte daher nicht. Vielmehr sollte versucht werden, durch die nichtkovalente Inkorporation von Transferrin in die AVP3-Partikel, eine Optimierung des Systems hinsichtlich Spezifität und Verwendbarkeit für eine *in vivo* Anwendung zu erreichen. Die einfache Inkorporation von Holo-Transferrin führte zwar zu einer höheren Transfektionsrate als der Einbau von Apo-Transferrin, welches sich durch eine deutlich schwächere Bindung an den Transferrin-Rezeptor auszeichnet (Qian und Tang, 1995), jedoch konnte eine Verbesserung der Transduktion in Zellkulturexperimenten gegenüber den AVP3 hierdurch nicht erreicht werden (s. Abb. 4.3.). Verantwortlich hierfür mag der weiter unter genauer diskutierte Effekt des Transferrins einer Abschirmung unspezifischer Phosphatidylserin-vermittelter Wechselwirkungen der Liposomenmembran mit der Zelloberfläche sein. Dieser Effekt, der auch für das Apo-Transferrin auftritt, wird jedoch durch die Erhöhung der spezifischen Transfektionsrate durch das Holo-Transferrin kompensiert.

In der weiteren Optimierung sollte dieser spezifische transfektionsverstärkende Effekt des Transferrins seine abschirmende Wirkung gegen unspezifische Wechselwirkungen nur kompensieren, sondern sogar deutlich überkompensieren. Hierfür wurde das schwach negative Transferrin zunächst mit dem stark kationischen Protaminsulfat (PrS) präkomplexiert, um zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Herstellung zu den Transfektionspartikeln zugegeben zu werden. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Transfektionseffizienz und Spezifität von Holo-Transferrin gegenüber Apo-Transferrin wurden mit einem Präkomplex aus 2 µg Protaminsulfat und 50 µg Transferrin erzielt, der vor der Zugabe der anionischen Liposomen zu den DNA/PEI-Partikeln gegeben wurde (s. Abbildungen 4.4., 4.5. und 4.6.). Für die optimale Effizienz ist also die Herstellung der Partikel von entscheidender Bedeutung, da das Transferrin

zum einen in für den Transferrin-Rezeptor erkennbarer Art und Weise an der Oberfläche der Partikel präsentiert werden muss und zum anderen da Ladungseffekte und Wechselwirkungen mit dem positiven DNA/PEI-Komplex einerseits oder den negativen Lipiden zu unerwünschten Konformationsänderungen im Transferrin-Molekül führen können (Simoes *et al.*, 1999). Für die Erhöhung der Effizienz kann zudem auch die Fähigkeit des Transferrins, die Freisetzung der Komplexe aus dem Endosom zu induzieren von Bedeutung sein, da insbesondere auch durch Apo-Transferrin eine - wenngleich deutlich geringere - Erhöhung der Transfektionseffizienz zu erkennen war (Cheng, 1996).

Diese sogenannten AVP3^{opt}-tf konnten reproduzierbar mit einer Größe von etwa 200-250 nm hergestellt werden (s. Abb. 4.7.) und erwiesen sich in Transfektionsexperimenten als deutlich weniger serumabhängig als AVP3 (s. Abbildung 4.9.). Insbesondere im Vergleich zu herkömmlichen verwendeten Transfektionsreagentien wie polymerem Superfect® sowie kationischem Lipofectin® oder Lipofectamin® zeigten sie sich als deutlich untoxischer (s. Abb. 4.8.).

Die nachfolgenden Untersuchungen bezüglich der Interaktion mit Serumproteinen und speziell Komplementfaktoren konnten zudem zeigen, dass das inkorporierte Transferrin nicht nur die Transfektion verstärkt, sondern die AVP3^{opt}-tf auch vor einer unspezifischen Interaktion mit Proteinen des Blutes, welche eine *in vivo* Anwendung limitieren bewahrt (Abbildungen 4.10. und 4.11.). Dass ein solcher Effekt insbesondere für eine systemische Anwendung unabdingbar ist und zu einer erfolgreichen Therapie führen kann, konnte bereits für kationische Lipoplexe gezeigt werden (Xu *et al.*, 2001). Dieser Effekt ist vermutlich auf die hydrophilen Bereiche des Transferrin-Moleküls zurückzuführen, welche die Ladung der AVP3^{opt}-tf-Partikel abzuschirmen vermögen (*shielding*) (Simoes *et al.*, 1998).

Die abschließenden Experimente zur Untersuchung der Zielzellspezifität der Partikel konnten zeigen, dass eine spezifische Zielsteuerung der AVP3^{opt-tf} durch die nichtkovalente Inkorporation von Transferrin möglich ist, da eine deutliche Transfektionserhöhung zum einen nur durch die Inkorporation von Holo-Transferrin - und nicht auch von Apo-Transferrin - und zum anderen nur auf Zellen, die den Transferrin-Rezeptor auch tatsächlich exprimieren, möglich ist (s. Abbildung 4.12. in Verbindung mit Abb. 4.13.).

4.3.2. AUSBLICK

Die hier vorgestellten AVP3^{opt-tf} stellen hinsichtlich ihres Transduktionsvermögens, ihrer Spezifität sowie ihres Wechselwirkungsverhaltens mit Serumproteinen sorgfältig optimierte und neuartige Transfektionskomplexe auf der Grundlage der AVP3 dar.

Zwar wurde Holo-Transferrin zur Erhöhung der Transfektionseffizienz bereits früher in kationische Lipopolyplexe nichtkovalent inkorporiert, ein eindeutiger Nachweis der vermittelten Spezifität blieb jedoch aus, zumal die gleiche Wirkung auch mit Apo-Transferrin erreicht werden konnte (Simoes *et al.*, 1999). Da die Wirkung des Transferrins für die AVP3^{opt-tf} nachweislich auf das Holo-Transferrin beschränkt bleibt, weisen die AVP3^{opt-tf} demgegenüber also eine ideale Inkorporation mit optimaler Präsentation des Transferrins an der Oberfläche auf.

Die Idee, die Komposition der verwendeten AVE-Liposomen zu verändern, um unspezifische Wechselwirkungen mit den Proteinen des Plasmas zu vermeiden (Nahde, 2000; Seite 80), wurde hier aufgrund der nur sehr geringen Transfektionseffizienz von AVP9, die sich zwar als sehr potente Träger von Chemotherapeutika erwiesen haben (s. hierzu Abschnitt 3), zugunsten einer Optimierung der Oberflächeneigenschaften verworfen. Insbesondere vermag das inkorporierte Transferrin, die negative Ladung des Phosphatidylserins, welches eine schnelle Elimination von

Transfektionskomplexen und Liposomen bedingt (Huong *et al.*, 2001), abzuschirmen.

Inwieweit das Protaminsulfat eine entscheidende Rolle neben der Präkomplexierung, z.B. hinsichtlich eines Kerntransportes spielt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden und sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Auch inwieweit andere kationische Polymere seine Funktion übernehmen können, bleibt unklar.

Die Möglichkeit, Transferrin mittels Protaminsulfat zu präkomplexieren und nichtkovalent in die Transfektionspartikel zu inkorporieren eröffnet die Möglichkeit, auch andere Liganden zur Zielsteuerung nach dieser Methode in die Liposomen einzubauen: denkbar wären z.B. Antikörperfragmente gegen tumorspezifische Oberflächenproteine (Li *et al.*, 2001). Auch hier muss jedoch stets ein besonderes Augenmerk auf die optimale Präsentation des Liganden an der Oberfläche der Transfektionspartikel gelegt werden.

5. Abschließende Diskussion, Zusammenfassung und Ausblick

5.1. DISKUSSION

Liposomen in Chemotherapie und Gentherapie: Vorteile gegenüber konventionellen Therapieformen, Limitationen und Optimierungsbedarf

Liposomale Therapieformen zur Behandlung infektiöser und maligner Erkrankungen - darunter insbesondere chemotherapeutische und gentherapeutische Ansätze - gehören derzeit zu den jüngsten und v.a. auch innovativsten medizinischen Anwendungen (Spack und Sorgi, 2001; Templeton, 2002; Barrat, 2003): Denn erst in den 90 er Jahren führte die epidemische Verbreitung des AIDS-bedingten Kaposi-Sarkoms zu klinischen Studien mit Doxorubicin-beladenen Liposomen (Cowens *et al.*, 1993; Harrington *et al.*, 1995), und auch die ersten gentherapeutischen klinischen Studien zur Behandlung von Melanomen fallen in diesen Zeitraum (Nabel *et al.*, 1993; Hui *et al.*, 1997).

Zwar konnten die Liposomen und Lipoplexe seit ihrer Entdeckung für eine systemische Anwendung in vielerlei Hinsicht optimiert werden (Harrington *et al.*, 2000 a und b; Nishikawa und Huang, 2001) - z.B. sei hier die Entwicklung von Polythylenglykol (PEG) inkorporierenden sterisch stabilisierten Liposomen als ein Meilenstein genannt (Lasic *et al.*, 1999) - , aber die kritische Hinterfragung solcher Verbesserungen bleibt dennoch Grundlage weiterer Optimierungen, wie sie in dieser Arbeit am Beispiel der bereits beschriebenen AVE-Formulierung (Müller *et al.*, 2001) erreicht wurden. Insbesondere die Unzulänglichkeiten bereits klinisch erprobter und angewandter Systeme, wie z.B. das verringerte Verpackungsvermögen und die verminderte Freisetzung des Inhaltsstoffs im Zielgewebe von sterisch stabilisierten Liposomen oder die hohe Toxizität und rasche Elimination aus der Blutzirkulation kationischer Lipoplex-Systeme, führten zu der Entwicklung

eines universellen liposomalen Vektors für chemo- und gentherapeutische Anwendungen auf der Grundlage des AVE-Systems. Die vor diesem Hintergrund in den vergangenen Kapiteln vorgestellten Optimierungen sind das Ergebnis bzw. Ausdruck des vieldimensionalen Anforderungsprofils optimaler Liposomen für eine erfolgreiche *in vivo* Anwendung im direkten Vergleich mit konventionellen chemotherapeutischen und viralen gentherapeutischen Anwendungen.

So liegen die Vorteile einer liposomalen gegenüber einer konventionellen Chemotherapie u.a. in der Fähigkeit der Liposomen, auch lipophile Substanzen effizient zu solubilisieren, ihren Inhaltsstoff nur langsam freizusetzen und gegen metabolisierende Enzyme zu schützen sowie diesen in Zielgeweben akkumulieren zu können (Crommelin *et al.*, 2002). Zudem zeichnen sich nichtvirale Systeme für gentherapeutische Anwendungen gegenüber viralen Systemen durch ihre mehrere Anwendungen ermöglichende Nichtimmunogenität und Sicherheit in der Anwendung aus sowie durch ihr Vermögen, selbst große DNA-Fragmente verpacken zu können (Tseng und Huang, 1998).

Hingegen liegen die Barrieren einer erfolgreichen systemischen Anwendung von Liposomen für den Transfer von Chemotherapeutika oder genetischer Information zum einen in der Adsorption von Plasmaproteinen, die eine rasche Erkennung und Elimination durch das retikulo-endotheliale System sowie eine gefährliche Embolisierung bedingen, und zum anderen in der nötigen Bioverfügbarkeit des liposomalen Inhalts am Zielgewebe - sei es durch die Freisetzung aus den Liposomen oder die Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung der Liposomen samt Inhalt (Bally *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1998).

Diese Barrieren zu überwinden, war das Ziel der hier vorgestellten Optimierungen mit dem Ergebnis in Form der AVE9 50%Chol DOX für eine effiziente chemotherapeutische Anwendung *in vivo* sowie den AVP3^{opt}-tf für eine spezifische und effiziente gentherapeutische Anwendung im *in vitro* Modell.

Die Vorgehensweise bei der Optimierung der AVE-Formulierung für eine chemotherapeutische Anwendung - ausgehend von den AVE3 und AVE6 - stellt eine neuartige und hier konsequent verfolgte Strategie dar, da hier nicht versucht wurde, die Oberflächeneigenschaften der Liposomen durch die Inkorporation hydrophiler Moleküle wie PEG oder Ganglioside abzusichern, sondern vielmehr die elementaren Eigenschaften der Lipidkomposition als Einflussfaktoren für das Verhalten der Liposomen in physiologischer Umgebung zu verstehen und dementsprechend zu modulieren.

Hierzu wurden zum einen einzelne Lipide, bei denen ein negativer Einfluss für die Plasmaverweildauer bereits beschrieben ist, wie z.B. das Phosphatidylserin, ersetzt, zum anderen wurden die verwendeten Phospholipide in ihren Eigenschaften wie z.B. der Länge der Fettsäureketten variiert. Auch synergistische Effekte von Bestandteilen der Lipidmembran wurden untersucht, darunter insbesondere das Zusammenwirken von Cholesterol und Sphingomyelin. Hierdurch konnte der dominante Einfluss des Phosphatidylserins, welches über unspezifische Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen sowie eine PS-Rezeptor-vermittelte Erkennung durch die Zellen des retikulo-endothelialen Systems eine rasche Elimination der Liposomen bewirkt, erkannt und bei der Entwicklung der AVE9 entsprechend umgesetzt werden.

Da die Plasmaverweildauer des liposomalen Trägers für eine erfolgreiche chemotherapeutische Anwendung neben der Bioverfügbarkeit des verpackten Inhaltsstoffs jedoch nur einer der entscheidenden Faktoren ist, musste zudem versucht werden, ein optimales Verhältnis von Stabilität der AVE9 im Blut einerseits und Destabilisierung im Tumorgewebe andererseits zu erreichen. Durch die Verwendung von 14 % Sphingomyelin und 50 % Cholesterol in den AVE9 wurde dieses optimale Verhältnis erreicht, welches die Liposomen im murinen Tiermodell sogar wirksamer gegen Tumore machte als DOXIL® - eine Formulierung, die sich im Tierexperiment durch eine besonders lange Verweildauer im Blut - also eine hohe Stabilität - aber

vermutlich geringere Bioverfügbarkeit des verpackten Doxorubizins im Tumor auszeichnete.

Mit der AVE9 50%Chol DOX-Formulierung wurde also eine Formulierung gefunden, die sich reproduzierbar herstellen sowie problemlos lagern läßt, und die eben nicht mit den Nachteilen sterisch stabilisierter Liposomen behaftet ist und sich insbesondere im direkten Vergleich mit einer handelsüblichen und bereits klinisch erprobten liposomalen Doxorubizinformulierung im murinen Modell als deutlich potenter erwies.

Für die Optimierung der AVP3 im Hinblick auf eine systemische gentherapeutische Anwendung wurde eine andere Vorgehensweise gewählt, da sich die elementaren Liposomeneigenschaften - insbesondere das Vorhandensein von Phosphatidylserin - als essentiell für eine effektive Transduktion von genetischem Material erwiesen. Um die Zielzellspezifität derart zu modulieren, dass eine hoch effiziente Transduktion bei gleichzeitigem Abschirmen der für eine *in vivo* Anwendung nachteiligen Eigenschaften der Lipidbestandteile der Lipopolyplexe möglich würde, wurde Transferrin nichtkovalent als Präkomplex mit Protaminsulfat in die Lipopolyplexe inkorporiert. Zwar konnten durch die kovalente Verbindung von Transferrin mit Doxorubizin (Barabas *et al.*, 1992), Polythylenglycol-Lipiden (Ishida *et al.*, 2001; Derycke und Witte, 2002) sowie Polyethylenimin (Ogris *et al.*, 2001) erste Erfolge hinsichtlich einer Zielzellsteuerung von Liposomen sowie Lipoplexen erzielt werden, jedoch wurde bislang die nichtkovalente Inkorporation in Lipoplexe nur für kationische Lipoplexe gezeigt (Cheng, 1996; Simoes *et al.*, 1998) und blieb hier ohne den klaren Nachweis einer Transferrin-vermittelten Spezifität (Simoes *et al.*, 1999).

Mit der Entwicklung der AVP3^{opt}-tf, einem Lipopolyplex auf der Grundlage anionischer AVE3-Liposomen in Verbindung mit DNA/PEI-Partikeln und einem Protaminsulfat-Transferrin-Präkomplex, ist es somit erstmals gelungen, die abschirmenden Eigenschaften des Transferrins (Kircheis *et al.*, 2001) mit seiner Fähigkeit, eine Rezeptor-vermittelte Endozytose zu induzieren, für eine spezifische Zielsteuerung in einem Lipopolyplex zu kombinieren.

5.2. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

AVE9 als universelle Träger von Chemotherapeutika; in vivo Optimierung und Anwendung von AVP3^{opt}-tf

Die AVE9 als neuartiges liposomales Trägersystem von Doxorubizin konnten hinsichtlich Stabilität im Blut und Destabilisierung im Tumorgewebe als optimale Formulierung entwickelt werden. Alle weiteren Untersuchungen und Optimierungen sollten daher sorgfältig vor dem Hintergrund der ursprünglichen Ausgangssituation sowie den wichtigsten Erkenntnissen der bisherigen Untersuchungen vorgenommen werden. Ausgehend von den schwerwiegenden Nachteilen sterisch stabilisierter Liposomen - darunter insbesondere ihr verringertes Verpackungsvermögen, ihre geringere Aufnahme in die Zielzellen sowie die auftretenden Immunreaktionen bei wiederholten Anwendungen - führten die hier dargestellten Optimierungen zu dem Ergebnis einer neuartigen konventionellen Liposomenformulierung. Hierbei stellte sich insbesondere das Gleichgewicht zweier diskreter Eigenschaften der Liposomen - nämlich Stabilität im Blut und kontrollierte Destabilisierung im Tumor - als wichtigster Faktor für eine erfolgreiche therapeutische Wirkung heraus¹. Daher muss bei allen vorgeschlagenen weiteren Variationen, wie z.B. der in den Lipiden verwendeten Fettsäureketten oder der Inkorporation von Liganden zur Zielsteuerung der Liposomen, besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, wie sich diese Veränderungen der Lipidkomposition auf das Verhalten der Liposomen nicht nur hinsichtlich ihrer Plasmaverweildauer, sondern insbesondere auch hinsichtlich Stabilität und Destabilisierung auswirken. Eine weitere Untersuchung, inwieweit diese Eigenschaften auch nach Verpackung anderer Chemotherapeutika vorliegen oder aber vom jeweils verpackten

¹So wurden die AVE3 DOX schnell durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems eliminiert, während die AVE9 35%Chol DOX zwar lange zirkulierten, dabei jedoch ihren Inhaltsstoff frühzeitig freisetzen. Und während DOXIL® zwar besonders stabil den Inhaltsstoff verpacken konnte, vermochten es nur die AVE9 50%Chol DOX diesen zudem effizient im Tumorgewebe bioverfügbar zu machen.

Inhaltsstoff abhängen, muss folgen, um die AVE9 endgültig als einen universellen Träger von Chemotherapeutika zu etablieren.

Hinzu sollten Untersuchungen weiterer Tumormodelle folgen, darunter langsam wachsende sowie schnell metastasierende Tumorarten, um zu untersuchen, inwieweit hier eine kurative Behandlung möglich ist. In diesem Zusammenhang ist dann die Frage, inwieweit das Bindungsverhalten der AVE9 50%Chol DOX an das Tumorendothel für ihren therapeutischen Erfolg entscheidend ist, zu diskutieren. Ausgehend vom murinen Modell atymischer Mäuse sollte ferner untersucht werden, ob in immunkompetenten Mäusen bei wiederholten Anwendungen die bei sterisch stabilisierten Liposomen beobachteten Immunreaktionen, ausbleiben.

Wichtig ist also bei allen weiteren Variationen die gleichzeitige Beachtung aller erfolgsentscheidenden Determinanten, damit eine Optimierung nicht nur hinsichtlich eines Faktors, wie z.B. der Plasmaverweildauer des liposomalen Trägers oder seiner Verpackungsstabilität, erfolgt, sondern die diffizile Mehrdimensionalität der morphologischen Liposomeneigenschaften ins Kalkül zieht.

Mit den AVP3^{opt}-tf ist die Entwicklung eines innovativen Lipopolyplex-Transduktionssystems auf der Grundlage anionischer Liposomen gelungen, welches gleichermaßen hohe Transduktionseffizienz sowie Transferrin-vermittelte Zielzellspezifität und Abschirmung gegen unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen des Plasmas in sich vereinigt. Ausgangspunkt der Optimierung war in diesem Fall der eingeschränkte Zielzelltropismus der bereits beschriebenen AVP3-RGD sowie ein nur geringes Transduktionsvermögen eines AVP-Systems auf der Grundlage der AVE9 und der dadurch bedingten Notwendigkeit, die AVP Partikel auf der Grundlage der AVE3 vor der Phosphatidylserin-vermittelten Elimination zu bewahren. Der nächste Schritt einer Optimierung sollten nunmehr - analog wie es für die AVE-Liposomen als Träger von Chemotherapeutika hier beschrieben wurde - die *in vivo* Untersuchung der Halbwertszeit sowie der

Organverteilung, der Tumorakkumulation und der Expression des Reportergens im Tumor sein. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Größe der Komplexe gelegt werden sowie darauf, ob sich die pharmakokinetischen Parameter ebenfalls durch Lipidvariationen optimieren lassen. Eine *in vivo* Optimierung der AVP3^{opt}-tf kann zudem die Verwendung anderer kürzer- oder längerkettiger Polyethylenimine sowie automatisierte Herstellungsmethoden und Mengenvariationen der verwendeten Bestandteile, darunter besonders des zielsteuernden und abschirmenden Transferrins, umfassen. Auch inwieweit eine Präkomplexierung mit Polyethylenimin anstelle des Protaminsulfats möglich ist und inwieweit ein Kerntransport-vermittelnder Effekt des Protaminsulfats tatsächlich eine entscheidende Rolle für die effiziente Expression des transduzierten Reportergens spielt, kann im Rahmen solcher Variationen untersucht werden. Inwieweit die geschickte Kombination aus Zielzellsteuerung und Abschirmung ebenfalls durch die Inkorporation anderer Liganden, wie z.B. Antikörperfragmente, wie sie für kationische Lipide *in vitro* bereits gezeigt wurde (Li *et al.*, 2001), erreicht werden kann, muss für dieses Lipopolyplexsystem erst noch gezeigt werden. In jedem Fall muss in einem solchen Fall ein besonderes Augenmerk auf die Herstellung der Partikel gelegt werden, da die Präsentation solcher Liganden auf der Oberfläche der Komplexe aufgrund ihrer Größe und Ladung von anderen Parametern abhängen kann, als sie für das Transferrin wichtig waren.

Was für die Optimierung des AVE-Trägersystems gilt, gilt also gleichermaßen für ein Lipopolyplexsystem auf AVE-Basis: dass nämlich bei allen weiteren Variationen dieses Systems seine besonderen Eigenschaften - bedingt durch das komplexe Zusammenwirken seiner unterschiedlichen Bestandteile - berücksichtigt werden müssen, da durch den Austausch oder die Variation bereits eines Bestandteils die morphologischen und physiologischen Eigenschaften des gesamten Lipopolyplexes in nicht immer eindeutig vorhersehbarer Weise verändert werden können.

6. Material und Methoden

6.1. GERÄTE

Zentrifugen:	Tischzentrifuge Typ Biofuge pico (Fa. Heraeus, Hanau) Kühlzentrifuge J-6M/E (Fa. Beckmann, München) mit Rotor JS-4.2 Kühlzentrifuge RC-5B (Fa. Heraeus, Hanau) mit Rotoren HB-6 und SS-34 Labor-Zentrifuge Typ Multifuge 3s und 3sr (Fa. Heraeus, Hanau)
Inkubatoren:	CO ₂ -begasbarer Brutschrank, 37°C, Modell Cytoperm (Fa. Heraeus, Hanau) CO ₂ -begasbarer Brutschrank, 37°C, Modell BBD6220 (Fa. Heraeus, Hanau) Brutschrank Function Line Modell B12, nicht begasbar (Fa. Heraeus, Hanau) Brutschrank Function Line Modell B6, nicht begasbar (Fa. Heraeus, Hanau) Schüttelinkubator Multitron II (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz)
Heizblock:	Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg) Dri-Block DB-1 (Fa. Techne, Dextford-Cambridge, England)
Netzgeräte:	Power Supply Model 100/200 (Fa. BioRad, Krefeld) ST 504 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Elektrophorese:	Power Pac 200 und 300 (Fa. BioRad, München) Gelapparatur für SDS-PAGE Mini-Protean® II (Fa. BioRad, München) Minisubcell für Agarosegele (Fa. Biorad, München)
Mikroskope:	Leitz Aristoplan Fluoreszenzmikroskop mit Filtereinheiten N2.1, A Mikroskop Typ DMIL (Fa. Leica, Wetzlar) Fluoreszenzmikroskop BX 51 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
Gefäße:	Bakterienschalen 100 x 15 mm (Fa. Greiner, Nürtingen) Einfrierröhrchen 1ml (Fa. Nunc, Wiesbaden) Eppendorf-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Fa. Nunc, Wiesbaden) PP-Röhrchen 12 ml, 15 ml und 50 ml (Fa. Greiner, Nürtingen) PS-Röhrchen 15 ml (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Zellkulturflaschen (Fa. Greiner, Nürtingen) Zellkulturschalen (Fa. Nunc, Wiesbaden) Duranglasflaschen 50, 100, 250, 500, 1000 ml (Fa. Schott, Mainz) PS-1/2 Mikro-Küvetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
Konzentratoren:	Vivaspin 500 µl (Fa. Vivascience, Hannover) Vivaspin 2 ml (Fa. Vivascience, Hannover)
Osmometer:	Gefrierpunktsosmometer Osmomat 030 (Fa. Gonotec GmbH, Berlin)
Extruder:	LiposoFast (Fa. Avestin Inc., Ottawa, Canada)

Rot.-Verdampfer:	Laborota 4000 efficient mit Vac Control Automatic (Fa. Heidolph, Kelheim) mit Vakuum-Membranpumpe
HPLC-Anlagen:	Waters Alliance 2695 separation module, 996 PDA Detektor, 474 Fluoreszenz Detektor und Empower Software Personal Edition (Fa. Waters, Eschborn)
HPLC Säulen:	CC 125/3 Lichrospher 100-5 RP-18 column (Macherey und Nagel, Düren)
GPC Trenngele:	Sepharose 4B (Fa. Amersham Bioscience, Bucks, England)
Waagen:	Feinwaage MX 5 (Fa. Mettler Toledo GmbH, Gießen) Analysenwaage AE 240 (Fa. Mettler Toledo GmbH, Gießen) Laborwaage GS 620-2 (Fa. Kern & Sohn GmbH, Balingen)
Sonstige:	Autoklav (Fa. Schütt, Olching) FACSCalibur (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) Magnetrührer Modell IKAMAG REO (Fa. IKA Labortechnik, Staufen) Mikrowelle Privileg 7533P (Fa. Quelle, Fürth) Reinstwasseranlage Milli Q synthesis A 10 (Fa. Millipore, Schwalbach) pH-Meter 766 calimatic (Fa. Knick GmbH & Co., Berlin) Pipetten (Fa. Mettler Toledo GmbH, Gießen und Fa. Eppendorf, Hamburg) PTC-200 Peltier Thermocycler (Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) Ultra-Turrax T 8 (Fa. Ika, Staufen) Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa. Heraeus, Hanau) Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa. Messer Griesheim, Düsseldorf) Speed Vac Univapo 150 H (Fa. Kraupa, Martinsried) Photometer Ultrospec 3300 pro (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg) AutoLumat LB 953 Luminometer mit Drucker (Fa. Berthold, Wildbad) UV-Schirm Modell Transluminator mit Videokamera, Bildschirm (Fa. UVP Inc., San Gabriel, USA) Videoprinter Modell P68 E (Fa. Mitsubishi, Japan) Spectro-Max ELISA reader (Fa. MWG Biotech, Ebe) Geltrockner Model 583 (Fa. BioRad, München) Vortex Heidolph Reax 2000 (Fa. Heidolph, Kelheim) Minishaker MS 2 (Fa. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) UV-Schirm mit Videokamera, Bildschirm und Videoprinter Modell Classic Uno (Fa. INTAS, Göttingen) Wasserbad A100 (Fa. Lauda, Lauda-Königshofen) beheizbarer Magnetrührer MR 3001 (Fa. Heidolph, Kelheim) Luminescence Spektrometer LS 55 (Fa. Perkin Elmer Inc., Wellesley, USA) Zetasizer 3000 HS (Fa. Malvern Instruments, Herrenberg) Mikroplattenphotometer Emax Microplate Reader (Fa. molecular devices, Ismaning) Flüssigzintilationszähler LS 6500 (Fa. Beckman Coulter, Unterschleißheim-Lohhof) Vakuum-Trockenschrank KVTS 11 (Fa. Salvis AG, Emmenbrücke-Luzern, Schweiz) Drehschieberölpumpe Typ RD-4 (Fa. Müller+Krempel AG, Bülach) 0,22 µm Millex-GV Sterilfiltern (Fa. Millipore, Schwalbach)

6.2. ALLGEMEINE LÖSUNGEN

Allgemein:

H₂O: Milli-Q gereinigt und autoklaviert

PBS [phosphate buffered saline]: 6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
2,5 mM KCl,
140 mM NaCl
pH 7,25; autoklaviert

Tris-Puffer: 10mM Tris,
eingestellt auf pH 7,4

Bakterienkultur:

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Trypton,
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % NaCl
pH 7,5 (eingestellt mit 1N NaOH)

LB-Agar: LB-Medium mit 1 % (w/v) Bacto-Agar
pH 7,5 (eingestellt mit 1N NaOH)

Zellkultur:

FACS-Wasch-Puffer : 1 % BSA
in PBS

FACS-Block-Puffer : 1 % BSA
10% humanes Serum
in PBS

Spezielle Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

6.3. ANTIKÖRPER

Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper: sc-7327 (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz / USA)

Negativ-Kontroll-Isotyp-Antikörper: Maus IgG1kappa (MOPC21) M-9269 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Cy3-anti-Maus-Antikörper: Cy3-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG (Fa. Dianova, Hamburg)

6.4. CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.A. und wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Difco (Detroit, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Messer-Griesheim (Düsseldorf), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

6.5. KITS UND SONSTIGES

Qiagen Maxi-Kit und Midi-Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

WST-1-reagenz (Fa. Roche, Mannheim)

Gesamthämolytische Komplementplatten (Fa. The Binding Site, Birmingham, England)

BioRad-DC-Protein Assay (Fa. BioRad, München) mit Lösungen A, B und S

6.6. ZELLKULTURMEDIENTEN UND –LÖSUNGEN SOWIE KULTURBEDINGUNGEN

DMEM¹: "Dulbeccos **m**odified **e**agle **m**edium", 4,5 g/l Glucose (Fa. BioWhittaker, Verviers / Belgien)

EGM-2: "Endothelial cell **g**rowth **m**edium", komplett als EGM-2 Kit: Basalmedium ("EBM") mit Supplementen und 2 % dialysiertem FCS angesetzt (Fa. Clonetics, Walkersville / USA, Vertrieb CellSystems, St. Katharinen)

Medium-199: (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

OptiMEM®: Serumreduziertes Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

FCS: „Fetal **c**alf **s**erum“ (Fa. Bio Whittaker, Verviers / Belgien)

L-Glutamin, 200 mM-Lösung (Fa. Bio Whittaker, Verviers / Belgien)

Penicillin 5000 units / Streptomycin 5000 mg/ml - Lösung (Fa. Bio Whittaker, Verviers / Belgien)

Trypsin 200 mg/l / EDTA 500 mg/l -Lösung (Fa. Bio Whittaker, Verviers / Belgien)

EDTA 0,02 % - Lösung (Fa. Boehringer, Mannheim)

DMSO [**D**imethyl**s**ulfo**x**id], höchster Reinheitsgrad (Fa. Merck, Darmstadt)

Gelatine (Fa. Sigma, Deisenhofen) 1 % in PBS

¹ Das Medium wurde, falls nicht besonders erwähnt, mit 10 % FCS, 1:100 L-Glutamin (200mM) und 1:100 Penicillin (5000 units/ml) / Streptomycin (5000 mg/ml) versetzt.

6.7. METHODEN

6.7.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN

6.7.1.1. VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME

DH5alpha; Genotyp: supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1
relA149

Nähere Erläuterungen hierzu siehe Sambrook *et al.* (1989) und Brown (1991).

6.7.1.2. KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON BAKTERIEN

Für die Amplifikation der verwendeten Plasmid-DNA wurde der E.coli Stamm DH5alpha verwendet, wobei die Vermehrung und Lagerung stets in sterilen Glas oder Plastikgefäßen erfolgte. Als Kulturmedium wurde Luria-Bertani Medium (LB) verwendet. Auch hierzu finden sich nähere Erläuterungen bei Sambrook *et al.* (1989) und Brown (1991) sowie bei den allgemeinen Lösungen (s. Abschnitt 6.2.).

6.7.1.3. HERSTELLUNG TRANSFORMATIONSKOMPETENTER BAKTERIEN

Bakterien wurden durch die Behandlung mit eiskalten Magnesium- und Kalziumchloridlösungen zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation) befähigt. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie DH5alpha inokuliert und üN im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Diese Kultur wurde in 300 ml LB-Medium in einen 2 l-Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer

OD₆₀₀ (Optische Dichte bei 600 nm) von 0,5 kultiviert. So wurde gewährleistet, dass sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 50 ml PP-Röhrchen bei (Fa. Greiner, Nürtingen) durch Zentrifugation bei 4°C und 2500 UpM für 5 min. pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 25 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in insgesamt 12 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach zweistündiger Inkubation auf Eis und Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % konnten die transformationskompetenten Bakterien nunmehr in 500 µl Aliquots bei -80°C dauergelagert werden.

6.7.1.4. TRANSFORMATION VON E. COLI

Für die Transformation wurden die obigen Aliquots transformationskompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Je 100 µl wurden zu einem µg Plasmid-DNA gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung von 42°C für 90 sek. Nach Abkühlen des Ansatzes für 3 min. auf Eis wurden je 900 µl Antibiotikum-freies LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 30 bis 45 min. bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden in 250 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator überführt.

6.7.1.5. QUANTITATIVE PLASMIDISOLIERUNG

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad zur Transfektion wurden die Anionenaustauschersäulen Tip 500 und die

entsprechenden Lösungen der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Hierzu wurden die 250 ml des obigen üN-Ansatzes am nächsten Morgen für 15 min. bei 4°C bei 3000 UpM pelletiert und gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Die aufgereinigten Plasmide wurden in sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch gemessen (s. Abschnitt 6.7.1.6.). Eine Kontrolle der DNA-Qualität erfolgte durch Restriktionsverdau (s. Abschnitt 6.7.1.7.) und Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 6.7.1.8.).

6.7.1.6. QUANTIFIZIERUNG VON PLASMID-DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten bestimmt.

Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml Plasmid-DNA.

6.7.1.7. RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA

Restriktionsverdaus wurden mit Enzymen der Firma NewEnglandBiolabs (Schwalbach) durchgeführt. Dabei wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei der vom Hersteller für die jeweiligen Enzyme empfohlenen Temperatur.

6.7.1.8. ANALYSE VON DNA DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden horizontale 1 % ige TAE-Agarosegele mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Hierbei wird die DNA in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner die Fragmente sind, umso schneller bewegen sie sich bei gegebener Feldstärke auf die Anode zu. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker (1 kb-DNA-Leiter, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese betrug 30 min. bis 2 h. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter dokumentiert werden.

50 x TAE [Tris-Acetat-EDTA]:	242g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 37,2 g Na ₂ Ethyldiamintetraessigsäure x 2H ₂ O ad 1l H ₂ O pH 8,5
Probenpuffer	1 ml 50 x TAE 2,5 ml 1005 Glyzerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O

6.7.1.9. VERWENDETE PLASMIDE

pGL3control	(Fa. Promega, Mannheim)
pGL3TYR	(Jerome <i>et al.</i> , 1998)
pVWF-2P	(Nettelbeck <i>et al.</i> , 1998)
H2B-GFP	(dankend erhalten von Dr. Teru Kanda, La Jolla/ USA)

6.7.1.10. HERSTELLUNG VON LIPOFECTAMIN®-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN

Basierend auf den Angaben des Herstellers (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurde in 3,5 cm Zellkulturschalen wie folgt transfiziert:

<u>Lösung A:</u> 10 µl Lipofectamin (1 mg/ml) 100 µl OptiMEM
<u>Lösung B:</u> 3 µg Plasmid-DNA 100 µl OptiMEM

Nachdem beide Lösungen in Polystyrolröhrchen getrennt hergestellt worden waren, wurden sie durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich miteinander vermischt und anschließend 45 min. bei RT inkubiert.

Nach Waschen mit PBS und Zugabe von je 1 ml OptiMEM je well wurde dieser Transfektionsansatz zupipettiert.

6.7.1.11. HERSTELLUNG VON LIPOFECTIN®-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN

Basierend auf den Angaben des Herstellers (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurde in 3,5 cm Zellkulturschalen wie folgt transfiziert:

<u>Lösung A:</u> 10 µl Lipofectin (1 mg/ml) 100 µl OptiMEM
--

Lösung B:

3 µg Plasmid-DNA

100 µl OptiMEM

Beide Lösungen wurden zunächst in Polystyrolröhrchen hergestellt und Lösung A zunächst 45 min. bei RT inkubiert.

Nach Waschen mit PBS und Zugabe von je 1 ml OptiMEM je well wurde dieser Transfektionsansatz zupipettiert. Anschließend wurden die Lösungen wurden sie durch gründliches Auf-und Abpipettieren miteinander vermischt und weitere 15 min. bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Transfektionsansatz mit weiteren 1 ml OptiMEM zupipettiert.

6.7.1.12. HERSTELLUNG VON SUPERFECT®-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN

Basierend auf den Angaben des Herstellers (Fa. Qiagen, Hilden) wurde in 3,5 cm Zellkulturschalen wie folgt transfiziert:

2 µg Plasmid-DNA

98 µl OptiMEM

10 µl Superfect (3 mg/ml)

Unter strikter Beibehaltung der obigen Reihenfolge wurde der Transfektionsansatz pipettiert, durch gründliches Auf- und Abpipettieren gut gemischt und bei RT für 15 min. inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Transfektionsansatz in weiteren 600 µl normalem Zellkulturmedium inkubiert.

6.7.1.13. HERSTELLUNG VON AVP3/9 (ARTIFICIAL VIRUS-LIKE PARTICLE)-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN SOWIE TRANSFERRIN-INKORPORIERENDEN AVP3-TF-UND AVP3^{OPT}-TF-TRANSFEKTIONSKOMPLEXEN

Folgende Lösungen wurden zunächst getrennt voneinander hergestellt:

<u>Lösung 1:</u> 15 µg Plasmid-DNA ad 90 µl Tris-Puffer pH 7.4
<u>Lösung 2:</u> 44,55 µg PEI ad 156 µl H ₂ O
<u>Lösung 3:</u> 2-20 µg Protaminsulfat (lt. Text) 0-50 µg Transferrin (lt. Text) ad 30 µl Tris-Puffer pH 7.4

Für die Herstellung von AVP-Transfektionskomplexen wurde Lösung 2 durch 10 maliges Auf- und Abpipettieren mit Lösung 1 zur Ausbildung der DNA-PEI-Komplexe gemischt und für 15 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Liposomen zupipettiert und der Ansatz durch 15 maliges Auf- und Abpipettieren geschert und weitere 10 min. zur Ausbildung der fertigen DNA-PEI-Lipid-Komplexe (=AVP-Transfektionskomplexe) inkubiert.

Die Herstellung von AVP-tf-Transfektionskomplexen erfolgte analog, indem zunächst Lösung 2 durch 10 maliges Auf- und Abpipettieren mit Lösung 1 zur Ausbildung der DNA-PEI-Komplexe gemischt und anschließend für 15 min. bei RT inkubiert wurde. Zu dieser Lösung wurde die Lösung 3 pipettiert, die zuvor 10 min. bei RT inkubiert worden war. Zur Ausbildung der DNA-PEI-(PS-tf)-Komplexe wurde der Ansatz für weitere 10 min. inkubiert. Anschließend wurden die Liposomen zupipettiert und der Ansatz durch 15 maliges Auf-

und Abpipettieren geschert und weitere 10 min. zur Ausbildung der fertigen DNA-PEI-(PS-tf)-Lipid-Komplexe (=AVP^{opt}-tf-Transfektionskomplexe) inkubiert.

Je nach Angabe im Text wurde diese Standard-Pipettierreihenfolge verändert.

Je ein Drittel des Transfektionsansatzes wurde nach Zugabe von 1 ml Medium 199/ 10 % FCS pro 3,5 cm Zellkulturschale auf die Zellen gegeben.

Die Zellen wurden 1 h bei 37°C im CO₂-begasbaren Brutschrank inkubiert und anschließend in normalem Zellkulturmedium kultiviert.

6.7.1.14. PROTEINBESTIMMUNG

Die Proteinbestimmung von Luziferase-Assay-Proben (s. Abschnitt 6.7.2.4.) sowie von Proteinfractionen aus der Untersuchung der Interaktion von Liposomen mit humanem Vollplasma (s. Abschnitt 6.7.4.2.) erfolgte modifiziert nach Lowry (Lowry, 1951), basierend auf der Reduktion von Folin-Reagenz durch Kupfer-behandelte Proteine. Für die Blaufärbung des Reagenzes sind in erster Linie die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie zu einem geringeren Anteil Cystein und Histidin verantwortlich.

Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß dem Protokoll des BioRad-DC-Protein Assays (Fa. BioRad, München). Hierzu wurde je 1 µl des Zelllysats, bzw. der gesammelten Fraktion in 9 µl Reinstwasser verdünnt und mit Lösung 25 µl der Lösung A' versetzt, die zuvor frisch durch Ansatz von 20 µl Lösung S je ml Lösung A hergestellt worden war. Nach Zugabe von 200 µl der Lösung B konnte nach 15 minütiger Inkubation bei RT die Absorption in Mikrotiterplatten bei 750 nm mittels eines Emax ELISA Readers (Fa. Molecular Devices, Ismaning) gemessen werden. Mithilfe einer BSA-Eichgerade konnte die Proteinkonzentration in den Lysaten und Fraktionen bestimmt werden.

6.7.1.15. SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Plasmaproteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden die Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β -Mercaptoethanol reduziert. Mittels der Bindung von SDS an hydrophobe Regionen eines Proteins werden negative Ladungen eingeführt, welche die Eigenladung des Proteins derart überdecken, dass die Mobilität des Proteins im Acrylamidgel nicht mehr von ihrem isoelektrischen Punkt, sondern nur noch von ihrer Größe abhängt.

Die zur Auftrennung der Proteine verwendeten Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel. Dabei hatten die verwendeten Sammelgele eine Acrylamidendkonzentration von 3 %, die Trenngele von 8 % und beide eine Endkonzentration von 1 % SDS.

Nach Gießen des Trenngels wurde dieses vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche entstehen zu lassen. Nach Abschluß der Polymerisierung – erkennbar an einer deutlichen Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel – wurde der Isopropanol abgeschüttet und das Trenngel gegossen.

Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 5 min. bei 95°C erhitzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im SDS-Laufpuffer zunächst bei 80 V im Sammelgel und anschließend bei 120 V im Trenngel.

Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das Sammelgel entfernt und das Gel in Silberfärbung-Fixierlösung (s. Abschnitt 6.7.1.16.) mindestens 15 min. fixiert und derart für eine anschließende Silberfärbung vorbereitet.

Für die Trenn- und Sammelgellösung wurden angesetzt:

	Trenngel	Sammelgel
	8 %	3 %
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	2,5 ml	-
H ₂ O dest.	4,7 ml	6,4 ml
30 % PAA	2,7 ml	1,0 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

AA [**A**cryl**a**mid-Stocklösung]: 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid – Fertigmix (Fa. Roth, Karlsruhe)

APS [**A**mmonium**p**ersulfat]: 10 % in H₂O

TEMED [N, N ,N',N' - **T**etramethylethylendi**a**min] (Fa. Sigma / Deisenhofen)

SDS-Probenpuffer: 30 % (v/v) Glyzin
 3 % (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)
 62,5 mM Tris/HCl pH 6.8
 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 2 µg/ml Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer (pH 8.6): 52 mM Tris-Base
 53 mM Glyzin
 0,1 % (w/v) SDS

6.7.1.16. SILBERFÄRBUNG VON SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Für die Silberfärbung unter Anleitung von Herrn Dr. Jürgen Adamkiewics und Herrn Bernhard Wilke am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg wurden die mindestens 15 min. in Fixierlösung vorfixierten SDS-Polyacrylamidgele ein weiteres Mal für mindestens 15 min. in Fixierlösung nachfixiert und anschließend für die eigentliche Silberfärbung in Sensibilisierungs-Lösung 30 bis 60 min. bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte

erfolgten ebenfalls bei RT. Die Acrylamidgele wurden 4 mal für 5 min. mit Wasser gewaschen und anschließend für genau 20 min. in frisch angesetzter Silberlösung gefärbt. Nach erneutem zweimaligen Waschen erfolgte die Entwicklung der Gele in Entwicklungs-Lösung, bis nach 1 bis 2 min. deutliche Banden zu erkennen waren. Mittels Stop-Lösung wurde die Entwicklungs-Reaktion beendet und die Gele erneut 3 mal mit Wasser gewaschen. Anschließend konnten die Gele bei 4°C in der Aufbewahrungs-Lösung gelagert werden.

Silberfärbungs-Fixierlösung:	10 % Eisessig 40 % Ethanol in H ₂ O
Silberfärbungs-Sensibilisierungslösung:	30 % Ethanol 2g/l Natriumthiosulfat 68g/l Natriumazetat in H ₂ O
Silberlösung:	0,25 % Silbernitrat In H ₂ O
Silberfärbungs-Entwicklungslösung:	2,5 % Natriumkarbonat 400 µl/l Formalinlösung 37 % in H ₂ O
Silberfärbungs-Stopplösung:	14,6 g/l EDTA In H ₂ O
Silberfärbungs-Aufbewahrungslösung:	1 % Eisessig 15 % Ethanol in H ₂ O

6.7.1.17. GESAMTHÄMOLYTISCHER KOMPLEMENTASSAY

Zur Untersuchung der Interaktion von Liposomen mit den Komplementfaktoren des Blutes wurden gesamthämolytische Komplementplatten (Fa. The Binding Site, Birmingham/ England) verwendet, auf denen in einer Agarose-Matrix Schaferythrozyten mittels Kaninchen-Anti-Schaferythrozyten-Antikörpern (Hämolysin genannt) lyseempfindlich gemacht wurden. Das an den Schaferythrozyten immobilisierte Hämolysin fixiert seinerseits das Komplementprotein C1 des radial aus den eingestanzten Vertiefungen in die Matrix diffundierenden

Serums und induziert die Komplementkaskade mit schlussendlicher Lyse der Erythrozyten.

Binden hingegen Liposomen ihrerseits ebenfalls während einer vorangehenden Inkubation mit dem humanen Serum Komplementfaktoren, so können diese nicht mehr durch das Hämolysin an den Erythrozyten fixiert werden und es kommt nicht zur Lyse.

Für die Durchführung des Assays wurden 0,5 nmol bis 16 nmol Lipid, bzw. 0,3 µg bis 2,5 µg DNA in 5 µl Tris-Puffer mit 5 µl des Serums 15 min. bei RT inkubiert und anschließend in die eingestanzten Vertiefungen der Agarose-Matrix pipettiert. Die Platten wurden daraufhin 12-14 h bei 4°C und anschließend für 30 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die Reaktion der Komplementkaskade entstand im Folgenden um die Vertiefungen herum eine klare, kreisförmige Zone.

6.7.1.18. UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG VON AVP- UND AVP-TF-TRANSFEKTIONS-KOMPLEXEN MIT RINDERSERUM MITTELS OBERFLÄCHEN-PLASMONRESONANZ-SPEKTROSKOPIE

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie basiert auf der totalen internen Reflexion des Lichts beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium. Bei Überschreiten eines kritischen Winkels passiert kein Licht mehr das optisch dünnere Medium, sondern das Licht wird total in das optisch dünnere Medium reflektiert. Mittels Resonanzkopplung absorbieren frei oszillierende Elektronen einer inerten Goldoberfläche an der Phasengrenze die Energie des Lichts, was einen charakteristischen Abfall der Lichtintensität des reflektierten Lichts bewirkt. Jedwede Änderung der chemischen Zusammensetzung im Bereich des Plasmonfeldes, insbesondere molekulare Wechselwirkungen zwischen an der Phasengrenze immobilisierten Substanzen mit Substanzen im

vorbeiströmenden Lösungsmittel verändern den Brechungsindex und resultieren in einer Änderung des Lichtsignals, gemessen in Resonanzeinheiten Δ RU.

Die Untersuchung der Interaktion von an eine inerte Goldoberfläche immobilisiertem Serum und in Lösung befindlichen Transfektionskomplexen erfolgte in einem BIACORE 2000 (BIA: Biomolekulare Interaktionsanalyse). Hierfür wurde zunächst ein BIACORE Sensorchip CM 5 (Fa. Biacore, Freiburg) mit 50 μ l EDC/NHS aktiviert, um auf der Carboxymethyldextranmatrix aktive Ester zu bilden, die spontan mit Amingruppen des zu immobilisierenden Serums reagieren. Zur Immobilierung wurden 70 μ l von 1:1000 in Acetatpuffer pH 5 verdünntem Serum injiziert. Freie Estergruppen wurden anschließend mit 40 μ l Ethanolamin deaktiviert. Anschließend wurde das System mit mindestens 500 μ l HBS-EP-Puffer gewaschen.

Die Interaktionsanalyse erfolgte durch Injektion von jeweils 30 μ l 1:1000 in HBS-EP-Puffer verdünnten Transfektionskomplexen bei einer Flussrate von 10 μ l pro Minute. Die Regeneration des Chips nach erfolgter Bindungsanalyse erfolgte mittels 30 μ l 100 mM NaOH.

NHS (N-hydroxysuccinimid)-Lösung: 115 mg /10 ml

EDC (N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid: 750 mg /10 ml

1 M Ethanolamin Hydrochlorid pH 8.5

HBS-EP-Puffer: 0,01 M HEPES pH 7.4

0,15 M NaCl

3 mM EDTA

0,005 % (v/v) Surfactant P20

Alle Substanzen wurden von der Fa. Biacore (Freiburg) bezogen.

6.7.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

6.7.2.1. VERWENDETE ZELLEN

Zelle	Herkunft	Zelltyp	Medium	Passagierung
HUVEC	Präparation aus humaner Nabelschnur	Humane Endothelzellen der Nabelschnur, primär, Passage 1 bis 6	EGM-2	1:4
Colon 26	DKFZ Heidelberg	Murine Colonkarzinomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
MeWo	I. Hart, London	Humane Melanomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:4
BSF1	M. Klaus; Bad Nauheim	Murine Fibrosarkomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
HMB-2	I. Hart; London	Humane Melanomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:4
C6	ATCC	Rattenglioblastomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
A549	ATCC	Humane Lungenadenokarzinomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
DU 145	Prof. Dr. Aumüller, Marburg	Humane Prostatakarzinomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5
JEG 3	Prof. Dr. Weilstein, Washington	Humane Chorionkarzinomzelllinie	DMEM, 10% FCS	1:5

6.7.2.2. PRÄPARATION PRIMÄRER HUMANER NABELVENENENDOTHELZELLEN (NACH JAFFE ET AL., 1986 MODIFIZIERT NACH THORNTON ET AL., 1983)

Primäre humane Umbilikalvenen-Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVEC) wurden aus Nabelschnüren, erhalten von der Universitäts-Frauenklinik in Marburg, maximal 48 h nach der Geburt unter einer Sicherheitswerkbank wie folgt präpariert: Die Nabelschnüre einer Länge von etwa 30 cm wurden zunächst grob gereinigt und deren Enden sauber abgeschnitten. Eine 13er Knopfkanüle wurde an einem Nabelschnurende in die Nabelvene eingeführt. Anschließend wurde die Vene mit mindestens 40 ml PBS gespült und dann mit etwa 20 ml Kollagenase gespült und gefüllt. Beide Enden der Nabelvene wurden abgeklemmt und die so vorbereitete Nabelschnur für mindestens 30 min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Daraufhin wurden die Klemmen entfernt, die Enden sauber abgeschnitten und die Endothelzellen mit FCS in ein 50 ml PP-Röhrchen gespült. Durch eine Zentrifugation bei 800 UpM wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 5 ml EGM-2 Medium aufgenommen und auf einer gelatinisierten 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Zur Entfernung der zunächst noch zahlreichen Erythrozyten wurden die adhärennten Endothelzellen am nächsten Tag ggf. mehrmals mit PBS gewaschen und in EGM-2-Medium bis zum Erreichen eines konfluenten Stadiums weiter kultiviert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen der Passage 2 in FCS/ 10 % DMSO eingefroren (s. Abschnitt 6.7.2.3.).

Kollagenase 0,05 % in PBS, sterilfiltriert

(Fa. Worthington Biochemical, Vertrieb:
Fa. PAN, Heidelberg),

6.7.2.3. PASSAGIEREN, EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Die aufgeführten Zelllinien (s. Abschnitt 6.7.2.1.) wurden routinemäßig in 10 cm Zellkulturschalen (Fa. Nunc, Wiesbaden), für HUVECS mit 1 % Gelatine in PBS vorbehandelt, in den jeweils angegebenen Medien bei 89 % Luftfeuchtigkeit und 37°C unter Begasung von 5 % CO₂ in Brutschränken kultiviert und je nach Wachstumseigenschaften alle 2 bis 4 Tage passagiert. Hierzu wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung, bzw. EDTA-Lösung abgelöst. Nachdem sich die Zellen als Zeichen der beginnenden Ablösung abgerundet hatten, wurde die Trypsin-EDTA-Lösung, bzw. EDTA-Lösung abgesaugt. Die Zellen wurden dann durch einen seitlichen Schlag gegen den Plattenboden abgelöst, im angegeben Medium aufgenommen, gründlich resuspendiert und im genannten Verhältnis erneut ausplattiert.

Für eine Langzeitlagerung wurden die suspendierten Zellen bei 800 UpM pelletiert, in Einfriermedium (jeweiliges Kulturmedium + 10 % DMSO) resuspendiert und in 1 ml-Einfrierröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) überführt.

Nach 24-stündiger Lagerung der Zellen bei -80°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um bei Bedarf eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese nach schnellem Auftauen im 37°C Wasserbad in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und durch tropfenweise Zugabe von 5 ml Medium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen bei 800 UpM abzentrifugiert und in 10 ml Zellkulturmedium gründlich resuspendiert und auf eine der Zellzahl entsprechenden Zellkulturschale ausgesät.

6.7.2.4. LUZIFERASE ASSAY

Der Luziferase Assay ist eine empfindliche, nicht radioaktive Nachweismethode für die Transfektion Luziferase-Reporter-gen-Konstrukten in Säugerzellen.

Hierbei wird eine Biolumineszenzreaktion durch das Enzym Luziferase katalysiert, das hierfür D-Luciferin als Substrat, ATP, Mg^{2+} und O_2 benötigt. Werden diese Reagenzien mit Zellysat, das Luziferase enthält, gemischt, so entsteht ein Lichtblitz, der in einem Luminometer detektiert werden kann.

Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen nach 24 bis 48 h nach Transfektion mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 250 μ l Lysis-Puffer und Inkubation für 5 min. bei RT lysiert. Anschließend wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 13.000 UpM für 5 min. zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes wurden zu je 360 μ l Assay-Puffer in Polystyrolröhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) pipettiert. Die Messung der RLUs (*relative light units*) erfolgte im Luminometer Typ AutoLumat LB 953 (Fa. Berthold, Bad Wildbad), in dem automatisch für jede Messung 100 μ l Luziferinlösung zur Probe injiziert wurden. Gemessen wurde das Integral der Lumineszenz über ein Intervall von 10 ms.

Zur Auswertung wurde der Leerwert (gemessen als Mittelwert aus 3 Messungen von 100 μ l Lysis-Puffer in 360 μ l Assay-Puffer) von den

Messwerten abgezogen und der Mittelwert und Standardabweichung aus drei Messwerten für jedes Konstrukt berechnet.

Die Experimente wurden mindestens einmal mit einer neuen Plasmidpräparation wiederholt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

Lysis-Puffer:	25 ml 0,1 M Glyzylglyzin (Fa. Sigma, Deisenhofen) pH 7,8 (mit 4 M KOH einstellen), bei -20°C/ 4°C lagern 10 ml 10 % (v/v) Triton 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 0,8 ml 0,5 M EGTA 62,6 ml H ₂ O; bei 4°C lagern 1 M DTT 1:1.000 vor Benutzung zugeben
Assay-Puffer:	25 ml 0,1 M Glyzylglyzin, pH 7,8 1,5 ml 1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 1,5 ml 1 M MgSO ₄ 0,8 ml 0,5 M EGTA, pH 8,0 2 ml 0,1 M ATP 69,1 ml H ₂ O; bei 4°C lagern 1 M DTT 1:1.000 vor Benutzung zugeben
Luziferin-Stock	1 mM D-Luziferin (kristallin, Fa. Sigma, Deisenhofen) 25 mM Glyzylglyzin, pH 7,8 10 mM DTT
Luziferinmeßlösung:	1:5 mit 25 mM Glyzylglyzin, pH 7,8 verdünnte Stocklösung

6.7.2.5. FACS-IMMUNFLUORESZENZ

Die auf die Expression des Transferrin-Rezeptors zu untersuchenden Zellen wurden mit 0,2 % EDTA-Lösung (Fa. Roche, Mannheim) von der Zellkulturschale abgelöst, in 500 µl FACS-Block-Puffer aufgenommen und für 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 1300 UpM für 5 min. pelletiert und in 50 µl des 1:20 in FACS-Block-Puffer (s. Abschnitt 6.2.) verdünnten Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörpers (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz / USA) resp. des 1:100 in FACS-Block-Puffer verdünnten Negativkontroll-Isotyp-Antikörpers (Fa. Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und 30 min. auf Eis inkubiert.

Daraufhin wurden die Zellen erneut wie oben pelletiert, einmal mit PBS gewaschen, wiederum pelletiert und 15 min. auf Eis in 50 µl des 1:100 in FACS-Block-Puffer verdünnten Cy3-konjugierten Zweitantikörpers Ziege-anti-Maus-IgG (Fa. Dianova, Hamburg) inkubiert. Schlußendlich wurden die Zellen pelletiert, in 500 µl FACS-Wasch-Puffer (s. Abschnitt 6.2.) aufgenommen und im FACSCalibur mittels Anregung bei 488 nm und Detektion im FL2-Kanal via 585 nm-Filter analysiert. Es wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

6.7.2.6. FACS-BINDUNGSSTUDIEN RHODAMIN-MARKIERTER LIPOSOMEN

Für die Messung der Bindung von Rhodamin-markierten Liposomen an Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen mit EDTA 0,02 % abgelöst und 200.000 Zellen je Probe in 200 µl phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS in Polystyrol-FACS-Röhrchen aufgenommen. Nach Zugabe von 100 nmol Lipid je Probe wurden die Zellen für 30 min. bei 4°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden je Probe 400 µl phenolrotfreies Medium mit 10 % FCS zugegeben und die Zellen lebend im FACSCalibur mittels Anregung bei 488 nm und Detektion im FL2-Kanal via 585 nm-Filter vermessen. Es wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

6.7.2.7. MIKROSKOPISCHE BINDUNGSSTUDIEN RHODAMIN-MARKIERTER LIPOSOMEN

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen derart ausplattiert, dass sie am übernächsten Tag zu etwa 70 % konfluent waren.

Je 200 nmol Rhodamin-markierter Liposomen wurden in 1 ml frisch aufgelegtem Medium M199 / 10 % FCS für 1 h bei 37°C im CO₂-begasbaren Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit

PBS gewaschen und für 15 min. mit einer 3,7 % igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und schließlich mit Mowiol (Fa. Calbiochem, Schwalbach) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops Olympus BX 51 und digitaler Fotoeinheit SIS CC-12 mit zugehöriger Analysis®-Software.

6.7.2.8. FACS-AUFNAHMESTUDIEN DOXORUBIZIN-BELADENER LIPOSOMEN

Für die Messung der intrazellulären Aufnahme von freiem oder liposomal verpacktem Doxorubizin wurden die zu untersuchenden Zellen mit EDTA 0,02 % abgelöst und 200.000 Zellen je Probe in 200 µl phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS in Polystyrol-FACS-Röhrchen aufgenommen. Nach Zugabe von 100 nmol Lipid je Probe wurden die Zellen für 30 min. bei 37°C im CO₂ begasbaren Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je Probe 400 µl phenolrotfreies Medium mit 10 % FCS zugegeben und die Zellen lebend im FACSCalibur mittels Anregung bei 488 nm und Detektion im FL2-Kanal via 585 nm-Filter vermessen. Es wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

6.7.2.9. MIKROSKOPISCHE AUFNAHMESTUDIEN DOXORUBIZIN-BELADENER LIPOSOMEN

Die zu untersuchenden Zellen wurden derart auf Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen ausplattiert, dass sie am übernächsten Tag zu etwa 70 % konfluent waren.

Je 20 nmol freies oder liposomal verpacktes Doxorubizin wurden in 1 ml frisch aufgelegtem Medium M199 / 10 % FCS für 2 Stunden bei 37°C im CO₂-begasbaren Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min. mit einer 3,7 % igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und schließlich mit Mowiol (Fa. Calbiochem, Schwalbach) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops Olympus BX 51 und digitaler Fotoeinheit SIS CC-12 mit zugehöriger Analysis®-Software.

6.7.2.10. WST-TOXIZITÄTSASSAY

Für die Untersuchung der Toxizität verschiedener liposomaler Zellen wurde die mitochondriale Aktivität gesunder Zellen untersucht. Hierbei wird durch eine mitochondriale Dehydrogenase ein Benzendisulfonat (WST-1-Reagenz, Fa. Roche, Mannheim) in einen Formazanfarbstoff überführt, der bei 440 nm spektrophotometrisch vermessen werden kann.

Die zu untersuchenden Zellen wurden derart auf 3,5 cm Schalen ausplattiert, dass sie am übernächsten Tag zu etwa 80 % konfluent waren.

Die jeweiligen Transfektionskomplexe (s. Abschnitt 6.7.1.10. bis 6.7.1.13.) sowie das freie oder liposomal verpackte Doxorubizin wurden für 6 bis 72 h (wie angegeben) auf den Zellen belassen.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min. bei 37°C im Brutschrank mit 300 µl phenolrotfreiem DMEM-Medium mit 10 % WST-1-Reagenz (Fa. Roche, Mannheim) inkubiert. 100 µl Medium wurden anschließend abgenommen und bei 440 nm in einem Emax ELISA Reader (Fa. Molecular Devices, Ismaning) gemessen.

Für die Auswertung wurde der Leerwert (gemessen als Mittelwert aus mindestens zwei Messungen von jeweils 100 µl phenolrotfreiem DMEM-Medium mit 10 % WST-1-Reagenz) von den Messwerten abgezogen und Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte berechnet.

6.7.2.11. KRYOELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Die Gefrierbruchabbildungen und kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Liposomen wurden durch Herrn Andreas Graser von der vectron therapeutics AG in Marburg sowie Herrn Steiniger vom Zentrum für Elektronenmikroskopie in Jena erstellt.

6.7.3. TIEREXPERIMENTE

6.7.3.1. HALTUNG DER VERSUCHSTIERE UND INDUKTION INTRADERMALER TUMORE

Als Versuchstiere dienten immuninkompetente Nacktmäuse (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 20-30 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 28°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere erhielten Wasser und pelletiertes Futter Altromin 1324 (Fa. Altromin, Lage) ad libidum.

Zur Induktion intradermaler Tumoren wurden den Tieren 5×10^5 bis 3×10^6 Tumorzellen in 300 μ l Zellkulturmedium DMEM intradermal in die seitliche Rückenflanke injiziert.

6.7.3.2. UNTERSUCHUNGEN DER PHARMAKOKINETIK UND DER ORGAN-VERTEILUNG RADIOAKTIV MARKIERTER LIPOSOMEN

Für die Untersuchung der Pharmakokinetik sowie der Organverteilung von Liposomen mittels Flüssigszintillationszählung wurden je Maus 1000 nmol Gesamtlipid, entsprechend 10 μ Ci in einem Gesamtvolumen von 300 μ l – verdünnt im jeweiligen Herstellungspuffer – intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach genau festgelegten Zeitpunkten wurden retroorbital (um eine fälschliche Kontamination mit Restaktivität im Bereich der Schwanzvene zu vermeiden) Blutproben entnommen und deren Volumina bestimmt.

Nach Tötung der Mäuse mittels Genickbruch erfolgte die Präparation der einzelnen zu untersuchenden Gewebe. Nach anschließender Gesamtgewichtsbestimmung wurden je Organ etwa 200-250 mg in vorbereitete 20 ml Szintillationsgefäße eingewogen, für die Leber wurden 3 Proben aus den unterschiedlichen Leberlappen eingewogen.

Die anschließende Aufarbeitung der Proben erfolgte nach Mahn und Lofberg (1966) durch Solubilisierung der Gewebestücke mittels 200 µl 70 % iger Perchlorsäure sowie Entfärbung mittels 400 µl 30 % iger Wasserstoffperoxidlösung über Nacht bei 60°C.

Für die Bestimmung der Restaktivität im Körper der Maus wurde der Kadaver in 20 ml 70 % iger Perchlorsäure sowie 40 ml 30 % iger Wasserstoffperoxidlösung über Nacht bei 60°C solubilisiert und entfärbt. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl (bzw. 20 ml für die Untersuchung des Kadavers) Eisessig versetzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10 ml Aquasol-2 Flüssigszintillationscocktail versetzt und gründlich gevortext.

Die Radioaktivität wurde im H3-, bzw. C14-Fensters eines LS 6500 Beta-Flüssigszintillationszählers (Fa. Beckmann Coulter, Unterschleissheim-Lohhof) bestimmt. Die Messdauer betrug 5 min. bei einer Standardabweichung von 1 %.

Die gemessenen Radioaktivitäten wurden auf das Gesamtgewicht des jeweiligen Organs bezogen - wobei für die Blutwerte 70 ml Blut je kg Körpergewicht angenommen wurden - und als prozentualer Anteil der insgesamt in die jeweilige Maus injizierte Menge ausgewiesen.

Für jede injizierte Liposomencharge wurde jeweils im gleichen Experiment die insgesamt injizierte Menge mittels Flüssigszintillationszählung wie oben gemessen.

Aquasol-2 (Fa. PerkinElmer, Jügesheim)
2 % Paraformaldehyd in PBS

6.7.3.3. UNTERSUCHUNGEN DER PHARMAKOKINETIK SOWIE DER ORGAN-VERTEILUNG VON FREIEM UND LIPOSOMAL VERPACKTEM DOXORUBIZIN

Für die Untersuchung der Pharmakokinetik sowie der Organverteilung von freiem und liposomalverpackten Doxorubizin mittels HPLC wurden je Maus

200 µg freies oder liposomal verpacktes Doxorubizin in einem Gesamtvolumen von 400 µl verdünnt in PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach genau festgelegten Zeitpunkten wurden retroorbital Blutproben entnommen und deren Volumina bestimmt.

Nach Tötung der Mäuse erfolgte die Präparation der einzelnen zu untersuchenden Gewebe. Jedes Organ wurde nach der Bestimmung des jeweiligen Gewichts eingewogen und mittels HPLC auf seinen Doxorubizingehalt hin untersucht (s. Abschnitt 6.7.4.11.).

6.7.3.4. UNTERSUCHUNG DER ORGANVERTEILUNG RHODAMIN-MARKIERTER LIPOSOMEN UND ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN

Für die Untersuchung der Organverteilung Rhodamin-markierter Liposomen wurden je Maus 2000 nmol Gesamtlipid in einem Gesamtvolumen von 300 µl – verdünnt im jeweiligen Herstellungspuffer - intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 6 h wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet und die Gewebe in situ mittels Perfusion von etwa 20 ml 2 % iger Paraformaldehyd/ PBS-Lösung fixiert. Es wurden die Lunge, sowie Leber und Milz für die Anfertigung von Kryoschnitten präpariert.

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die mit Kryomatrix (Fa. Leica, Nussloch) auf Korkplättchen fixierten und überschichteten Gewebestücke zunächst in Flüssigstickstoff-gekühltem Mehtylbutan komplett durchgefroren und anschließend zur weiteren Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

Die Schnitte einer Dicke von 8 - 12 µm wurden im Kryostaten Leica CM 3050 S (Fa. Leica, Nussloch) angefertigt und bis zur mikroskopischen Untersuchung 10 – 15 min. bei RT getrocknet. Auch die angefertigten Schnitte konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Die Auswertung erfolgte mittels eines Mikroskops Typ DMIL (Fa. Leica, Wetzlar).

6.7.3.5. UNTERSUCHUNG DES TUMORWACHSTUMS NACH BEHANDLUNG MIT FREIEM ODER LIPOSOMALEM DOXORUBIZIN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Den Versuchstieren wurden etwa eine Woche zuvor 500.000 colon 26 Tumorzellen wie oben beschrieben intradermal appliziert. Sobald die soliden Tumoren eine Größe von etwa 3-5mm x 3-5mm besaßen, wurde mit der Behandlung begonnen.

An den Tagen 0 (Versuchsbeginn), 2 und 5 wurden den weiblichen Tieren, die in Gruppen von je 5 Mäusen gehalten wurden, die frisch angesetzten Formulierungen (s. Abschnitt 6.7.4.5.) intravenös in die seitlichen Schwanzvenen injiziert.

Die Tumorgöße wurde alle ein bis zwei Tage gemessen. Das Tumolvolumen² wurde hieraus nach folgender Formel bestimmt:

$$V=(L \times B^2)/2$$

L = größte Länge des Tumors (in mm)

B = größte Breite des Tumors (in mm)

V = Tumolvolumen (in mm³)

Zur statistischen Auswertung der erfassten und normalverteilten Datensätze (Tumolvolumen in mm³) des Versuchs zur Untersuchung des Tumorwachstums bei Behandlung mit freien oder liposomalen Chemotherapeutika wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test nach Student verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde vor Versuchsbeginn auf p=0,05 festgelegt.

Die Berechnungen erfolgten mit der in C++ programmierten und als freie Software unter <http://www.statpages.org/miller/openstat/OS.html> oder <http://www.agrvisser.com/cgi-bin/English/Default.htm> (Stand 04/2003) erhältlichen OpenStat2 Software von Bill Miller (wgmill@Acces-4-Free.com).

² Standardabweichungen, die der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht in den jeweiligen Abbildungen angegeben sind, sind den jeweiligen Tabellen im Anhang 8.1. zu entnehmen.

6.7.4. PHARMAZEUTISCH-TECHNOLOGISCHE UND -ANALYTISCHE METHODEN

6.7.4.1. VORBEREITUNG VON SÄULEN ZUR ABTRENNUNG VON LIPOSOMEN MITTELS GRÖßENAUSSCHLUßCHROMATOGRAPHIE

Um nicht in Liposomen eingeschlossene freie Substanzen von liposomal verpackten Substanzen oder an Liposomen gebundene Proteine von freien nicht gebundenen Plasmaproteinen abzutrennen, wurde die Größenausschlußchromatographie eingesetzt.

Die unterschiedlichen Eindringmöglichkeiten und -dauern der Probepartikel unterschiedlicher Größe in die Poren der Gelmatrix bewirkt eine Trennung der Partikel nach ihrer Größe, wobei unterschieden wird zwischen Substanzen, die ungehindert in alle Poren eindringen können (Lösungsmittel und Elutionspuffer), Substanzen, die nur in Poren ab einer gewissen Größe eindringen können (z.B. Plasmaproteine) und Substanzen, die zu groß sind, um überhaupt in Poren eindringen zu können (z.B. Liposomen). Letzere werden stets als erste eluiert, da sie sich nicht in den Poren der Gelmatrix aufhalten und dort verweilen. Je kleiner die Substanzen werden, umso länger erfolgt eine Interaktion mit den Poren der Gelmatrix und umso später werden sie eluiert.

Zur Abtrennung von Liposomen mittels Größenausschlußchromatographie wurden zunächst die bereits vorgequollene Gelmatrix Sepharose 4B (Amersham Pharmacia, Freiburg) sowie PBS als Laufpuffer mittels Ultraschall entgast. Die sorgfältig entgaste Gelmatrix wurde anschließend vorsichtig und ohne Blasenbildung 10 cm hoch in eine 0,7 cm x 10 cm Biorad Econo- Säule (Fa. BioRad, München) gegossen und anschließend mit mindestens 200 ml PBS gewaschen und equilibriert. Nach Inkubation der Proben wurden diese vorsichtig tropfenweise auf das obere Gelbett pipettiert. Erst nach vollständigem Einlaufen der Probe in die Säulengelmatrix konnte mit der Elution mit PBS begonnen werden.

6.7.4.2. ABTRENNUNG FREIER UND LIPOSOMAL VERPACKTER INHALTSSTOFFE MITTELS GRÖßENAUSSCHLUßCHROMATOGRAPHIE

Zur Abtrennung von freier und liposomal verpackter Inhaltsstoffe mittels vorbereiteter gelchromatographischer Säulen wurden die Proben wie folgt vorbereitet und für 15 min. bis über Nacht inkubiert:

Probe	Inhaltsstoff	Untersuchungsmedium
HP	-	350 µl Humanplasma
AVE DOX	20 µg liposomales DOX in 50 µl PBS	350 µl PBS resp. 350 µl Humanplasma
DOX	20 µg freies DOX in 50 µl PBS	350 µl PBS resp. 350 µl Humanplasma

Es wurden Fraktionen von jeweils 560 µl gesammelt und ggf. zur Verringerung der Probenanzahl gepoolt.

6.7.4.3. UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION VON LIPOSOMEN MIT HUMANEM VOLLPLASMA UND ANSCHLIEßENDER ABTRENNUNG VON LIPOSOMEN MITTELS GRÖßENAUSSCHLUßCHROMATOGRAPHIE

Zur Untersuchung der liposomalen Interaktion von Liposomen mit Humanplasma wurden 3000 nmol Lipid mit 50 µl Humanplasma für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Liposomen mittels vorbereiteter gelchromatographischer Säulen mit PBS als Laufpuffer abgetrennt.

Es wurden Fraktionen von jeweils 600 µl gesammelt. Für jede zu untersuchende Liposomencharge wurde nach sorgfältiger Reinigung des

Säulenbettes mit Isopropanol und Aceton eine neue Säulengelmatrix gegossen.

Von ausgewählten Fraktionen wurden zur Fällung der Proteine zu einem 200 µl Aliquot der jeweils zu untersuchenden Fraktion 200 µl 20 % iger Trichloressigsäure pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Pelletierung der Proteine mittels Zentrifugation bei 13.000 UpM für 15 min. bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das jeweilige Pellet in 20 µl reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Die Neutralisation der Proben erfolgte mittels Ammoniakdampf. Anschließend wurden die Proben aufgeköcht und mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht (s. Abschnitt 6.7.1.14.).

6.7.4.4. HERSTELLUNG DER LIPOSOMEN

Die jeweiligen Liposomen wurden nach der Film/ Hydration-Methode (Szoka *et al.*, 1980; Mayer *et al.*, 1986) in Anlehnung an die Vorschriften von R.R.C New (1989) von Herrn Andreas Graser bei der vectron therapeutics AG in Marburg hergestellt.

Aus den in Chloroform gelösten Lipiden entstand im Rotationsverdampfer nach Abdampfen des Chloroforms für 15 min. bei 37 °C hierbei zunächst ein gleichmäßig dünner Lipidfilm. Nach Trocknung im Vakuum von 10 mbar für 45 min. zur restlosen Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die Rehydratisierung in PBS, Tris oder Zitratpuffer zu einer Konzentration von 10 nmol / µl. Die derart entstandene Dispersion großer multilamellarer Liposomen (MLV) wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen, um ein Quellen der Liposomen zu ermöglichen.

Durch 21 malige Druckfiltration (Extrusion) mittels eines LiposoFast Extruders (Fa. Avestin, Ottawa / Kanada) durch Polycarbonatmembranen mit einer

Porengröße von 50 nm (Fa. Avestin, Ottawa / Kanada) wurden Liposomen einer Größe von 40 – 80 nm hergestellt. Je nach Herstellungstemperatur wurde dieser Extrusionsschritt in einem speziell hierfür angefertigten Wasserbad durchgeführt.

Anschließend wurden die Liposomen mittels 0,22 µm Millex-GV Sterilfiltern (Fa. Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert und konnten bei 4°C gelagert werden.

Die Größe der Liposomen wurde mittels Photonenkorrelations-spektroskopie (PCS) bestimmt, die Messung der elektrischen Ladung der Liposomen (Zetapotential) erfolgte durch Laser Doppler Anemoemtrie.

6.7.4.5. EINBAU VON DOXORUBIZIN IN DIE LIPOSOMEN MITTELS *REMOTE-LOADING*

Der Einbau von schwach basischem Doxorubizin erfolgte mittels eines Transmembran-pH-Gradienten in bereits hergestellte Liposomen (*Remote Loading*).

Hierfür wurde von Frau Tanja Hilka bei der vectron therapeutics AG der Lipidfilm aus 10 µmol Lipid mit 300 mM Natrium-Zitratpuffer bei pH 4 hydratisiert. Durch Einstellung des Dispersionsmediums mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 wurde der für die Beladung notwendige pH-Gradient zwischen dem Liposomeninneren (pH 4) und dem umgebenden Dispersionsmediums erzeugt. Nach Erhitzen der Liposomensuspension auf 60°C wurde unter ständigem Vortexen das erforderliche Volumen der Wirkstoff-Lösung gegeben, der Ansatz mit PBS pH 7,4 auf einen ml aufgefüllt und für 15 min. bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Ankonzentration erfolgte in Vivaspin-Konzentratoren bei 2800 UpM bei 5°C für 10 min.

Bei einer Lipidmenge von 10 μmol (entsprechen etwa 6 mg Lipid) wurden 1200 μg Doxorubizin entsprechend einem Doxorubizin:Lipid-Gewichtsverhältnis von 1:5.

Der Gehalt an Doxorubizin in den Liposomen wurde mittels HPLC (s. Abschnitt 6.7.4.11.) bestimmt.

6.7.4.6. EINBAU VON RADIOAKTIV MARKIERTEM H^3 -CHOLESTERYLOEOYLETHER UND C^{14} -CHOLESTERYLOLEAT IN DIE LIPOSOMEN

Die radioaktiv markierten lipophilen Substanzen wurden zu Beginn der Film-Hydratisierungsmethode in den Lipidfilm eingebaut, indem H^3 -Cholesteryloeoylether gelöst in Toluol, bzw. C^{14} -Cholesterololeat gelöst in Chloroform zu den organischen Lipidlösungen hinzugegeben wurden.

6.7.4.7. GRÖßENBESTIMMUNG DER LIPOSOMEN UND KOMPLEXE MITTELS PHOTONEN-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (PCS)

Die PCS ist neben der Elektronenmikroskopie das einzige Verfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich. Sie misst als dynamisches Streulichtverfahren die Brownsche Molekularbewegung von dispergierten und ermittelt daraus die Partikelgröße.

Infolge der ungeordneten Bewegung ergeben sich zeitabhängige Intensitätsänderungen des gemessenen Streulichts, die mit zunehmender Größe der Partikel deutlich langsamer verlaufen.

Neben dem mittleren Teilchendurchmesser wird bei der PCS-Messung zudem auch die Breite der Größenverteilung (Polydispersität) als

Polydispersitätsindex (PI) angegeben. Je kleiner der PI, umso monodisperser ist die gemessene Verteilung der Partikelgrößen.

Bei Werten von $PI > 0,500$ spricht man von einer breiten Verteilung unbestimmten Form, das Ergebnis ist dann als solches nicht mehr auswertbar (Schumann, 1995).

Die Messung erfolgte als Dreifachmessung mit jeweils 10 Einzelbestimmungen in einem Zetasizer 3000 HS (Fa. Malvern Instruments, Malvern / UK). Hierfür wurden etwa 20 µl Liposomen, bzw. Komplexe in 1 ml destilliertem Wasser verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden.

6.7.4.8. MESSUNG DES ZETAPOTENTIALS VON LIPOSOMEN MITTELS LASER DOPPLER ANEMOMETRIE (LDA)

Bei der Bestimmung des Zetapotentials handelt es sich um die Charakterisierung eines suspendierten Partikels hinsichtlich seiner vom Dispersionsmittel abhängigen Oberflächenladung.

Die LDA basiert auf der Messung der Wanderungsgeschwindigkeit geladener dispergierter Teilchen unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes als direktes Maß für die elektrophoretische Mobilität der untersuchten Teilchen.

Die Messung erfolgt in einem Zetasizer 3000 HS (Fa. Malvern Instruments, Malvern / UK) mithilfe zweier sich kreuzender Laserstrahlen gleicher Intensität, jedoch unterschiedlicher Frequenz zur Erzeugung eines Interferenzmusters. Die Teilchen bewegen sich nun mit dem oder gegen das Interferenzbild und erzeugen derart eine Frequenzverschiebung (Doppler Effekt), aus der sich die Wanderungsrichtung des Partikels und somit das Vorzeichen seiner elektrischen Ladung ablesen lässt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ergibt sich aus der Frequenz des durch die

Teilchen gestreuten Lichts. Die elektrophoretische Mobilität wird gemäß der Smoluchowski-Näherung in das Zetapotential konvertiert.

6.7.4.9. PHOSPHATBESTIMMUNG

Die hier verwendete Methode zur Phosphatbestimmung der Liposomen beruht auf dem Bartlett Assay (Chen *et al.*, 1956). Dabei wird das in den Phospholipiden der Liposomen vorliegende organische Phosphat zunächst in anorganisches Phosphat umgewandelt, welches nach Reduktion mit Ascorbinsäure mit Molybdat einen blauen Farbkomplex bildet, welcher photometrisch vermessen werden kann. Da auch freies Phosphat durch den Test erfasst wird, darf das Dispersionsmedium der Liposomen kein Phosphat enthalten, eine Vermessung in PBS ist also derart nicht möglich.

Über den derart ermittelten Phosphatgehalt kann eine direkte Aussage über die in den Liposomen enthaltenen Phospholipide gemacht werden. Der Gehalt anderer, nicht bestimmbarer Lipide kann anschließend durch proportionale Hochrechnungen grob abgeschätzt werden.

100 µl der 1:100 verdünnten Proben wurden hierfür mit 200 µl 70 % iger Perchlorsäure versetzt und für 45 min. bei 190°C inkubiert. Nach 15 minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 2 ml eines Molybdat-Schwefelsäure-Reagenzes und 250 µl einer 10 % igen Ascorbinsäurelösung. Nach gründlichem Vortexen und 10 minütiger Inkubation bei 100°C wurden die Proben nach Abkühlung auf Raumtemperatur bei 812 nm (alternativ bei 750 nm) vermessen.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine DOPS-Stammlösung verwendet.

Molybdat-Reagenz: 2,2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$
14,3 ml H_2SO_4 konz
ad 1 L

DOPS-Stammlösung: 8,10 mg / ml (= 10 nmol / µl in Chloroform)

6.7.4.10. OSMOLARITÄTSBESTIMMUNG

Zu stark von einem blutisotonen Wert abweichende Osmolaritäten einer Liposomendispersion können bei einer intravasalen Anwendung zu einem Schrumpfen oder Anschwellen der Liposomen führen und derart die Integrität der Liposomenhülle beeinträchtigen, was wiederum zu einer frühzeitigen und unerwünschten Freisetzung des verpackten Inhaltsstoffs führen kann.

Die Messung der Osmolarität von je 50 µl der verwendeten Liposomendispersionen erfolgte in einem Osmomat 030 (Fa. Gonotec, Berlin). Hierbei wird die kolligative Eigenschaft des osmotischen Drucks zu reinem Wasser korreliert.

6.7.4.11. HPLC-METHODEN ZUR BESTIMMUNG DES LIPOSOMALEN DOXORUBIZINS

Die HPLC (*high performande liquid chromatography*) ist ein säulenchromatographisches Trennverfahren, bei dem für die Bewegung der mobilen Phase ein hoher Druck von 50 bis 250 bar angewandt wird. Sie dient zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse. Die hohe Trennleistung der HPLC, bei der die Auftrennung über Adsorptions-, Verteilungs- oder Ionenaustauschprozesse erfolgen kann, beruht auf einer besonders kleinen Partikelgröße und einer besonders engen Partikelgrößenverteilung der stationären Phase in der Trennsäule.

6.7.4.11.1. HPLC-BESTIMMUNG DES IN LIPOSOMEN VERPACKTEN DOXORUBIZINS

Für die quantitative Analyse des in die Liposomen verpackten Doxorubizins wurde von Frau Tanja Hilka bei der vectron therapeutics AG eine Trennung auf einer CC 125/3 LiChrosphere 100-5 RP 18 Säule (Fa. Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Als mobile Phase wurde 65 % Methanol/ 35 % PBS mit einem pH von 2,9 verwendet. Die Flußrate betrug dabei 0,5 ml pro Minute und die Temperatur des Säulenofens wurde auf 25°C festgelegt. Zur Detektion wurde ein Waters Fluoreszenzdetektor 474 herangezogen und die Detektion bei einer Emissionswellenlänge von 470 nm und einer Detektionswellenlänge von 555 nm durchgeführt.

Jeweils 100 µl der Proben wurden vor der Injektion in HPLC Vials überführt und 5 µl einer 20 % igen Triton X 100 Lösung zugegeben und gevortext. Nach 1 stündiger Inkubation wurden jeweils 5 µl dieses Gemisches injiziert.

6.7.4.11.2. HPLC-BESTIMMUNG DES DOXORUBIZINS AUS GEWEBEPROBEN

Für die Bestimmung des Doxorubizins in den untersuchten Organen wurden diese von Frau Tanja Hilka bei der vectron therapeutics AG nach der Entnahme zunächst gewogen und anschließend in PBS bei pH 7,4 aufgenommen, so dass eine Konzentration von 100 mg Organ pro ml erhalten wurde. Zur Bestimmung des Doxorubizingehaltes im Blut wurden 35 µl Blut auf 1 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben am Ultra-Turrax T 8 (Fa. Ika, Staufen) homogenisiert. Zu 500 µl der homogenisierten Proben wurden jeweils 50 µl einer 3 % igen Triton X-100 Lösung gegeben und der Ansatz für 10 min. gevortext. Danach wurden ebenfalls je 50 µl einer 65 % igen (m/V) Sulphosalicylsäurelösung hinzugefügt, ebenfalls für 10 min. gevortext und im Anschluß bei 20000 g für

10 min. zentrifugiert. 100 µl der so gewonnenen Proben wurden mit 5 µl 3 M Natriumacetatpuffer bei pH 4 gepuffert und in der oben beschriebenen Waters-HPLC mit derselben Säule analysiert. Die Analyse wurde bei einem Fluß von 0,5 ml pro min. und einer Temperatur von 40°C +/- 5°C gefahren. Als Elutionsmittel diente 0,05 M Na-acetat (pH 4,0) : Acetonitril im Verhältnis 72:28. Die injizierte Menge betrug pro Probe 50 µl und die Detektionsparameter entsprachen der oben erwähnten Doxorubizin-Bestimmung.

7. LITERATUR

Abra, R. M. und Hunt, C. A. (1981). Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects. *Biochim Biophys Acta* 666, 493-503.

Acton, S., et al. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-20.

Agarwal, K., et al. (1986). Effect of phospholipid structure on stability and survival times of liposomes in circulation. *Biochim Biophys Acta* 883, 468-75.

Agarwal, R. und Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 502-16.

Aghi, M., et al. (2000). Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med* 2, 148-64.

Aisen, P. (1994). The transferrin receptor and the release of iron from transferrin. *Adv Exp Med Biol* 356, 31-40.

Ali, M., et al. (1994). The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1, 367-84.

Allen, T. M. (1998). Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs* 56, 747-56.

Allen, T. M. (1981). A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 640, 385-97.

Allen, T. M. und Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 223, 42-6.

Allen, T. M., et al. (1991). Liposomes containing synthetic lipid derivatives of polyethylenglycol show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066, 29-36.

Allen, T. M. und Stuart, M. C. (1999). Liposome pharmacokinetics. Classical, sterically-stabilized, cationic liposomes and immunoliposomes. In *Liposomes: Rational Design*, A. S. Janoff, ed. (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 63-87.

Allison, A. C. und Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *nature* 252, 252.

Alving, C. R. (1991). Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J Immunol Methods* 140, 1-13.

Alving, C. R. (1984). Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans. *Biochem Soc Trans* 12, 342-4.

Alving, C. R. und Swartz, G. M., Jr. (1991). Antibodies to cholesterol, cholesterol conjugates and liposomes: implications for atherosclerosis and autoimmunity. *Crit Rev Immunol* 10, 441-53.

- Ambrosch, F., et al. (1997). Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine* 15, 1209-13.
- Anderson, W. F. (1998). Human gene therapy. *Nature* 393, 25-30.
- Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 991-4.
- Anklesaria, P. (2000). Gene therapy: a molecular approach to cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther* 2, 426-32.
- Ardt, D. und Zeisig, R. (2001). Liposomal Bleomycin: Increased therapeutic activity and decreased pulmonary toxicity in mice. *Drug Delivery* 8, 1-7.
- Artmann, C. W., et al. (1997). Vehikelabhängige Mikrozirkulation der Haut. *Z. Allg. Med.* 73.
- Augustin, H. G. (1998). Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 19, 216-22.
- Bachur, N. R., et al. (1977). Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol* 13, 901-10.
- Backer, M., et al. (2002). Molecular vehicles for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem* 13, 462-467.
- Bally, M. B., et al. (1999). Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 38, 291-315.
- Bally, M. B., et al. (1990). Liposomes with entrapped doxorubicin exhibit extended blood residence times. *Biochim Biophys Acta* 1023, 133-9.
- Bangham, A. D. (1968). Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol* 18, 29-95.
- Bangham, A. D., et al. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13, 238-52.
- Bangham, A. D. e. (1983). *Liposome Letters* (Academic Press).
- Barratt, G. M. (2000). Therapeutic applications of colloidal drug carriers. 3, 163-171.
- Baxter, L. T. und Jain, R. K. (1991). Transport of fluid and macromolecules in tumors. IV. A microscopic model of the perivascular distribution. *Microvasc Res* 41, 252-72.
- Behr, J. P. (1997). The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did not Exploit. *Chimia* 51, 34-36.
- Benihoud, K., et al. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10, 440-7.
- Benjamin, R. S., et al. (1977). Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Res* 37, 1416-20.

- Bielack, S. S., et al. (1996). Impact of scheduling on toxicity and clinical efficacy of doxorubicin: what do we know in the mid-nineties? *Eur J Cancer* 32A, 1652-60.
- Bisgaier, C. L., et al. (1989). Effects of apolipoproteins A-IV and A-I on the uptake of phospholipid liposomes by hepatocytes. *J Biol Chem* 264, 862-6.
- Black, C. D. und Gregoriadis, G. (1976). Interaction of liposomes with blood plasma proteins. *Biochem Soc Trans* 4, 253-6.
- Boehm-Viswanathan, T. (2000). Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy? *Curr Opin Oncol* 12, 89-94.
- Bonte, F. und Juliano, R. L. (1986). Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids* 40, 359-72.
- Boucek, R. J., Jr., et al. (1987). The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem* 262, 15851-6.
- Bradley, A. J., et al. (1998). Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids. *Arch Biochem Biophys* 357, 185-94.
- Branden, L. J., et al. (1999). A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotechnol* 17, 784-7.
- Brown, M. D., et al. (2001). Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 229, 1-21.
- Brüsselbach, S., et al. (2000). Novel liposomal vector complexes and their use in gene therapy. In *International Patent*.
- Capecchi, M. R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479-88.
- Chan, C. K. und Jans, D. A. (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum Gene Ther* 10, 1695-702.
- Chander, R. und Schreier, H. (1992). Artificial viral envelopes containing recombinant human immunodeficiency virus (HIV) gp160. *Life Sci* 50, 481-9.
- Chang, C. W., et al. (1997). Plasma clearance, biodistribution and therapeutic properties of mitoxantrone encapsulated in conventional and sterically stabilised liposomes after intravenous administration in BDF1 mice. *Br J Cancer* 75, 169-177.
- Chen, K. R., et al. (1996). Eosinophilic vasculitis in connective tissue disease. *J Am Acad Dermatol* 35, 173-82.
- Chen, P. S., et al. (1956). Microdetection of Phosphorus. *Analytical Chemistry* 28.
- Cheng, P. W. (1996). Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum Gene Ther* 7, 275-82.

- Chonn, A., et al. (1992). Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J Biol Chem* 267, 18759-65.
- Chonn, A., et al. (1995). Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles. *J Biol Chem* 270, 25845-9.
- Chu, G., et al. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acid Research* 15, 1311-1326.
- Citores, L., et al. (2002). Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin I. *Cancer Lett* 184, 29-35.
- Collard, W. T., et al. (2000). Biodistribution, metabolism and in vivo gene expression of low molecular weight glycopeptide polyethylene glycol peptide DNA-co-condensates. *J. Pharm. Sci.* 89, 499-512.
- Cortes, E. P., et al. (1978). Adriamycin cardiotoxicity: early detection by systolic time interval and possible prevention by coenzyme Q10. *Cancer Treat Rep* 62, 887-91.
- Creasey, W. A., et al. (1976). Clinical effects and pharmacokinetics of different dosage schedules of adriamycin. *Cancer Res* 36, 216-21.
- Crommelin, D. J., et al. (2002). Liposomes: Successful carrier systems for targeted delivery of drugs. *The Drug Delivery Companies Report Autumn/Winter*.
- Cummings, J., et al. (1995). Re-evaluation of the molecular pharmacology of mitomycin C. *Eur J Cancer* 31A, 1928-33.
- Daemen, T., et al. (1997). Different intrahepatic distribution of phosphatidylglycerol and phosphatidylserine liposomes in the rat. *Hepatology* 26, 416-23.
- Dams, E. T., et al. (2000). Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 1071-9.
- Dash, P. R., et al. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* 6, 643-50.
- Dass, C. R. und Burton, M. A. (1999). Lipoplexes and tumours. A review. *J Pharm Pharmacol* 51, 755-70.
- Davis, S. S., et al. (1985). Recent advances in the use of microspheres for targeted therapy. *Drugs Exp Clin Res* 11, 633-40.
- De Giovanni, C., et al. (2000). The prospects for cancer gene therapy. *Int J Immunopharmacol* 22, 1025-32.
- Dean, D. A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* 230, 293-302.
- Deol, P. und Khuller, G. K. (1997). Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. *Biochim Biophys Acta* 1334, 161-72.

Deol, P., et al. (1997). Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1211-4.

Derksen, J. T., et al. (1987). Interaction of immunoglobulin-coupled liposomes with rat liver macrophages in vitro. *Exp Cell Res* 168, 105-15.

Derksen, J. T., et al. (1988). Uptake and processing of immunoglobulin-coated liposomes by subpopulations of rat liver macrophages. *Biochim Biophys Acta* 971, 127-36.

Devine, D. V., et al. (1994). Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim Biophys Acta* 1191, 43-51.

Drummond, D. C., et al. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51, 691-743.

Durocher, J. R., et al. (1975). Role of sialic acid in erythrocyte survival. *Blood* 45, 11-20.

Dvorak, H. F., et al. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 233-5.

Dvorak, H. F., et al. (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 133, 95-109.

Eckhardt, S., et al. (1981). *Contributions to Oncology* (Basel: S. Karger).

Egilmez, N. K., et al. (1996). Evaluation and optimization of different cationic liposome formulations for in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 221, 169-73.

Eguchi, H., et al. (2000). Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6, 2881-90.

Ehninger, G. und Schuler, U. (1990). Pharmakokinetik und Stoffwechsel von Zytostatika und ihre therapeutische Relevanz-Anthrasykline. In *Klinische Pharmakologie und Onkologie*, H. J. Dengler and C. G. Schmidt, eds.: Gustav Fische Verlag).

Ehrlich, P. (1906). *Collected Studies on Immunity* (New York: John Wiley and Sons, Ltd.).

El Ouahabi, A., et al. (1997). The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett* 414, 187-92.

Fahr, A., et al. (2002). A new colloidal lipidic system for gene therapy. *J Liposome Res* 12, 37-44.

Farzaneh, F., et al. (1998). Gene therapy of cancer. *Immunol Today* 19, 294-6.

Faulds, D., et al. (1991). Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 41, 400-49.

- Felgner, P. L., et al. (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 8, 511-2.
- Felgner, P. L., et al. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7.
- Fidler, I. J., et al. (1980). Pulmonary localization of intravenously injected liposomes. *Recent Results Cancer Res* 75, 246-51.
- Fisher, K. D., et al. (2000). A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther* 7, 1337-43.
- Fleming, R. A. (1997). An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 17, 146S-154S.
- Forssen, E. und Willis, M. (1998). Ligand-targeted liposomes. *Adv Drug Del Rev* 29, 249-271.
- Forssen, E. A., et al. (1992). Selective in vivo localization of daunorubicin small unilamellar vesicles in solid tumors. *Cancer Res* 52, 3255-61.
- Forssen, E. A., et al. (1996). Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue. *Cancer Res* 56, 2066-75.
- Forssen, E. A. und Ross, M. E. (1994). DaunoXome treatment of solid tumors: preclinical and clinical investigations. *J Lipo Res* 4, 481-512.
- Frezard, F., et al. (1994). Fluorinated phosphatidylcholine-based liposomes: H⁺/Na⁺ permeability, active doxorubicin encapsulation and stability, in human serum. *Biochim Biophys Acta* 1194, 61-8.
- Funato, K., et al. (1992). Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim Biophys Acta* 1103, 198-204.
- Gabizon, A., et al. (1982). Liposomes as in vivo carriers of adriamycin: reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. *Cancer Res* 42, 4734-9.
- Gabizon, A., et al. (1998). Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *J Control Release* 53, 275-9.
- Gabizon, A., et al. (1994). Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncol* 33, 779-86.
- Gabizon, A. und Martin, F. (1997). Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 54 Suppl 4, 15-21.
- Gabizon, A. und Papahadjopoulos, D. (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6949-53.
- Gabizon, A. und Papahadjopoulos, D. (1992). The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1103, 94-100.

- Gabizon, A., et al. (1990). Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies. *Cancer Res* 50, 6371-8.
- Gabizon, A. A. (2002). Liposomal drug carrier systems in cancer chemotherapy: current status and future prospects. *J Drug Targeting* 10, 535-538.
- Gabizon, A. A. (1992). Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res* 52, 891-6.
- Galettis, P., et al. (1994). Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. *Br J Cancer* 70, 324-9.
- Gamelin, E., et al. (1997). Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 3, 891-9.
- Gao, X. und Huang, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 35, 1027-36.
- Gill, P. S., et al. (1995). Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J Clin Oncol* 13, 996-1003.
- Gilman, A. (1961). The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J surg* 105, 574-578.
- Glück, R., et al. (1994). Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in elderly people. *Lancet* 344, 160-163.
- Godbey, W. T., et al. (1999). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5177-81.
- Goebel, F. D., et al. (1996). Efficacy and safety of Stealth liposomal doxorubicin in AIDS-related Kaposi's sarcoma. The International SL-DOX Study Group. *Br J Cancer* 73, 989-94.
- Gomez-Navarro, J., et al. (1999). Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* 35, 2039-57.
- Graham, F. L. und Eb, A. J. v. d. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-67.
- Greenspan, P. und Gutman, R. L. (1994). Endocytosis of sulfatides by macrophages: relationship to the cellular uptake of phosphatidylserine. *J Leukoc Biol* 55, 99-104.
- Gregoriadis, G. (1999). DNA vaccines: a role for liposomes. *Curr Opin Mol Ther* 1, 39-42.
- Gregoriadis, G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 13, 527-37.
- Gregoriadis, G. (1988). Liposomes as a drug delivery system: optimization studies. *Adv Exp Med Biol* 238, 151-9.
- Gregoriadis, G. (1976). Medical applications of liposome-entrapped enzymes. *Methods Enzymol* 44, 698-709.

- Gregoriadis, G., et al. (2002). A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* 20 Suppl 5, B1-9.
- Gregoriadis, G. und Davis, C. (1979). Stability of liposomes in vivo and in vitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 89, 1287-93.
- Gregoriadis, G. und Florence, A. T. (1991). Liposomes and cancer therapy. *Cancer Cells* 3, 144-6.
- Gregoriadis, G., et al. (1996). Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Rel* 41, 107-110.
- Gregoriadis, G. und Neerunjun, D. E. (1974). Control of the rate of hepatic uptake and catabolism of liposome-entrapped proteins injected into rats. Possible therapeutic applications. *Eur J Biochem* 47, 179-85.
- Gregoriadis, G. und Ryman, B. E. (1972). Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur J Biochem* 24, 485-91.
- Gregoriadis, G. und Ryman, B. E. (1972). Lysosomal localisation of beta-fructofuranose-containing liposomes injected into rats. *Biochem J* 129, 123-133.
- Gregoriadis, G. und Ryman, B. E. (1972). Lysosomal localization of enzyme-containing liposomes injected into rats. *Biochem J* 128, 142P-143P.
- Gregoriadis, G., et al. (1974). Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* 1, 1313-6.
- Griffioen, A. W. und Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52, 237-68.
- Günzburg, W. H. und Salmons, B. (1995). Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1, 410-7.
- Hamann, H. J. und Nothelle, R. (1996). Industrial implementation of liposomal solubilisation: chemical, physicochemical and technical considerations (Freiburg).
- Han, S., et al. (2003). Prognostic implication of cyclin E expression and its relationship with cyclin D1 and p27Kip1 expression on tissue microarrays of node negative breast cancer. *J Surg Oncol* 83, 241-7.
- Han, X., et al. (1995). Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9747-9751.
- Hanahan, D. und Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-64.
- Handa, K. und Sato, S. (1975). Generation of free radicals of quinone group-containing anti-cancer chemicals in NADPH-microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann* 66, 43-7.

- Harashima, H., et al. (1994). Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res* 11, 402-6.
- Harashima, H., et al. (1993). Distinction between the depletion of opsonins and the saturation of uptake in the dose-dependent hepatic uptake of liposomes. *Pharm Res* 10, 606-10.
- Harasym, T. O., et al. (1997). Intratumor distribution of doxorubicin following i.v. administration of drug encapsulated in egg phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. *Cancer Chemother Pharmacol* 40, 309-317.
- Harasym, T. O., et al. (1998). Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 32, 99-118.
- Harrington, K. J., et al. (2000). Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: clinical development. *Clin Oncol* 12, 16-24.
- Harris, J. D. und Lemoine, N. R. (1996). Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet* 12, 400-5.
- Harvie, P., et al. (1998). Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation. *Biophys J* 75, 1040-51.
- Hashizume, H., et al. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156, 1363-80.
- Heine, D., et al. (2001). Cell surface display of a lysosomal enzyme for extracellular gene-directed enzyme prodrug therapy. *Gene Therapy* 8, 1005-1010.
- Hesketh, R. (1991). *The Oncogene Handbook*: London: Academic Press).
- Hockertz, S., et al. (1991). Immunotherapy of murine visceral leishmaniasis with murine recombinant interferon-gamma and MTP-PE encapsulated in liposomes. *J Interferon Res* 11, 177-85.
- Hope-Stone, H. F. (1986). *Radiotherapy in Clinical Practice*, 1. Auflage Edition (London: Butterworth).
- Huang, S. K., et al. (1992). Microscopic localisation of sterically stabilised liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res* 52, 5135-5143.
- Hueber, H. A. und Finch, C. A. (1987). The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol. Rev.* 67, 520-582.
- Huong, T. M., et al. (2001). The complement system enhances the clearance of phosphatidylserine (PS)-liposomes in rat and guinea pig. *Int J Pharm* 215, 197-205.
- Hutchinson, F. J. und Jones, M. N. (1988). Lectin-mediated targeting of liposomes to a model surface. An ELISA method. *FEBS Lett* 234, 493-6.
- Hwang, K. J. (1987). *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics* (Ostro MJ ed.) (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 109-156.
- Ishida, T., et al. (2002). Liposome clearance. *Biosci Rep* 22, 197-224.

Ishida, T., et al. (2001). Effect of cholesterol content in activation of the classical versus the alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. *Int J Pharm* 224, 69-79.

Ishikawa, Y. und Homcy, C. J. (1992). High efficiency gene transfer into mammalian cells by a double transfection protocol. *Nucleic Acids Res* 20, 4367.

Jaffe, E. (1986). *Biology of Endothelial Cells*, E. Jaffe, ed. (Boston: Martinus Nijhoff).

Jain, R. K. (1994). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American* 271, 58-65.

Jain, R. K. (2001). Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J Control Rel* 74, 7-25.

Jain, R. K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48, 2641-2658.

Joel, S. (1995). The comparative pharmacology of vincristine and vindesine - does vindesine offer any advantage in clinical use? *Cancer. Treat. Rev.* 21, 513-525.

Johnstone, S. A., et al. (2001). Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1513, 25-37.

Jorke, D. (1983). *Chemotherapie solider Tumoren: Möglichkeiten und Grenzen* (Jena: Jenaer Onkologie-Symposium).

Juliano, R. L. (1989). Liposomes as drug carriers in the therapy of infectious diseases. *Horiz Biochem Biophys* 9, 249-79.

Kabanov, A. V. (1999). Taking polycation gene delivery systems from *in vitro* to *in vivo*. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 2, 365-372.

Kabanov, A. V. und Kabanov, V. A. (1995). DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconj Chem* 6, 7-20.

Kamm, Y. J., et al. (1998). 5-Fluorouracil in colorectal cancer: rationale and clinical results of frequently used schedules. *Anticancer Drugs* 9, 371-80.

Kane, B. (2001). Cancer Chemotherapy: Teaching Old Drugs New Tricks. *Annals of Internal Medicine* 135, 1107-1110.

Kay, M. A., et al. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7, 33-40.

Keer, H., et al. (1990). Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *J. Urol.* 143.

Keyes, S. R., et al. (1987). The effects of adriamycin on intracellular calcium concentrations of L1210 murine leukemia cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23, 295-302.

- Kirby, C. und Gregoriadis, G. (1983). The effect of lipid composition of small unilamellar liposomes containing melphalan and vincristine on drug clearance after injection into mice. *Biochem Pharm* 32, 609-615.
- Kircheis, R. und al., e. (2001). Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Therapy* 8, 28-40.
- Kircheis, R., et al. (2001). Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther* 8, 28-40.
- Klibanov, A. L., et al. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 268, 235-7.
- Kodama, T., et al. (1996). Collagenous macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol* 7, 287-91.
- Kolonin, M., et al. (2001). Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 5, 308-13.
- Konerding, M. A., et al. (1989). The vascular system of xenotransplanted tumors--scanning electron and light microscopic studies. *Scanning Microsc* 3, 327-35; discussion 335-6.
- Konno, H., et al. (1991). Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant Interleukin-2. Antitumour effect of IL-2 Liposomes. *Biotherapy* 3, 211-218.
- Kono, K., et al. (2001). Novel gene delivery systems: complexes of fusigenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene Ther* 8, 5-12.
- Krieger, M. und Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63, 601-37.
- Kukowska-Latallo, J. F., et al. (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4897-902.
- Laing, R. B., et al. (1994). Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet* 344, 682.
- Langner, M. (2000). Effect of liposome molecular composition on its ability to carry drugs. *Pol J Pharmacol* 52, 3-14.
- Lasic, D. D. (1996). Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 380, 561-2.
- Lasic, D. D. (1997). *Liposomes in Gene Delivery*: CRC Press).
- Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: From Physics to Applications* (Amsterdam: Elsevier).
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* 16, 307-21.
- Lasic, D. D., et al. (1996). *Nonmedical Applications of Liposomes, Volume I-IV* (Boca Raton: CRC Press).

- Lasic, D. D., et al. (1995). Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 1239, 145-56.
- Lasic, D. D., et al. (1992). Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett* 312, 255-8.
- Lasic, D. D. und Papahadjopoulos, D. (1995). Liposomes revisited. *Science* 267, 1275-6.
- Lasic, D. D. und Papahadjopoulos, D. (1998). *Medical Applications of Liposomes* (Amsterdam: Elsevier).
- Laverman, P., et al. (2001). In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18, 551-66.
- Lee, R. J. und Huang, L. (1997). Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14, 173-206.
- Lee, R. J. und Low, P. (1994). Delivery of liposomes into KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 269.
- Legha, S. S., et al. (1982). Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med* 96, 133-9.
- Lennard, L. (1999). Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 47, 131-43.
- Leyland-Jones, B. (1993). Targeted drug delivery. *Semin Oncol* 20, 12-7.
- Li, S. und al., e. (1999). Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Therapy* 6.
- Li, S. und Huang, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy* 7, 31-34.
- Li, X., et al. (2001). Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 8, 555-65.
- Lian, T. und Ho, R. J. Y. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J pharm sci* 90, 667-680.
- Lim, H., et al. (2000). Role of drug release and liposome-mediated drug delivery in governing the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone used to treat human A431 and LS180 solid tumors. *The Journal of Pharmacologic and Experimental Therapeutics* 292, 337-345.
- Litzinger, D. C., et al. (1996). Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1281, 139-49.
- Liu, D., et al. (1995). Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1240, 277-84.

- Liu, Y., et al. (1995). Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J Biol Chem* 270, 24864-70.
- Livingston, R. B. (1994). Dose intensity and high dose therapy. Two different concepts. *Cancer* 74, 1177-83.
- Loutan, L., et al. (1994). Inactivated virosome hepatitis A vaccine. *Lancet* 343, 322-4.
- Lundstrom, K. (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 21, 117-22.
- Luo, D. und Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18, 33-7.
- Madden, T. D., et al. (1990). The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chem Phys Lipids* 53, 37-46.
- Mahato, R. I., et al. (1995). Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J Pharm Sci* 84, 1267-71.
- Marsh, J. C. (1976). The effects of cancer chemotherapeutic agents on normal hematopoietic precursor cells: a review. *Cancer Res* 36, 1853-82.
- Martin, F. J. (1997). Pegylated liposomal doxorubicin: scientific rationale and preclinical pharmacology. *Oncology (suppl.)* 11, 11-20.
- Martin, G. P. und Marriott, C. (1981). Membrane damage by bile salts: the protective function of phospholipids. *J Pharm Pharmacol* 33, 754-9.
- Maruyama, K., et al. (1990). Characterization of in vivo immunoliposome targeting to pulmonary endothelium. *J Pharm Sci* 79, 978-84.
- Maruyama, K., et al. (1999). Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 40, 89-102.
- Marx, J. (1994). How cells cycle toward cancer. *Science* 263, 319-21.
- Marx, J. (1994). Oncogenes reach a milestone. *Science* 266, 1942-4.
- May, P. M. und Williams, D. R. (1980). *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, ed. (New York: Marcel Dekker).
- Mayer, L. D., et al. (1990). Strategies for optimizing liposomal doxorubicin. *J liposome Res* 1, 464-480.
- Mayer, L. D., et al. (1994). The use of transmembrane pH gradient-driven drug encapsulation in the pharmacodynamic evaluation of liposomal doxorubicin. *J Liposomes Res* 4, 529.
- Mayer, L. D., et al. (1998). Designing therapeutically optimized liposomal anticancer delivery systems: Lessons from conventional liposomes. In *Medical Applications of liposomes*, L. a. Papahadjopoulos, ed.: Elsevier Science B.V.).

- Mayer, L. D., et al. (1990). Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochim Biophys Acta* 1025, 143-151.
- Mayew, E. und Papahadjopoulos, D. (1983). Therapeutic applications of liposomes, i. O. M. J. (Liposomes), ed. (New York: Marcel Dekker).
- McCormick, F. (2001). Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 1, 130-41.
- McKay, D. J., et al. (1986). Rainbow trout protamines. Amino acid sequences of six distinct proteins from a single testis. *Eur J Biochem* 158, 361-6.
- Metzger, H. (1991). Fc receptors and membrane immunoglobulin. *Curr Opin Immunol* 3, 40-6.
- Mezei, M. und Gulasekharan, V. (1982). Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J Pharm Pharmacol* 34, 473-4.
- Minow, R. A. und Gottlieb, J. A. (1975). Letter: Adriamycin cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 82, 855-6.
- Moghimi, S. M. und Patel, H. M. (1992). Opsonophagocytosis of liposomes by peritoneal macrophages and bone marrow reticuloendothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1135, 269-74.
- Moghimi, S. M. und Patel, H. M. (1998). Serum mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system: the concept of tissue specificity. *Adv Drug Del Rev* 32, 45-60.
- Mold, C. und Gewurz, H. (1981). Inhibitory effect of C-reactive protein on alternative C pathway activation by liposomes and *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 127, 2089-92.
- Monahan, P. E. und Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 6, 433-40.
- Monck, M. A., et al. (2000). Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J Drug Target* 7, 439-52.
- Moore, L., et al. (1977). Inhibition of the cardiac mitochondrial calcium pump by adriamycin in vitro. *Biochem Med* 18, 131-8.
- Morgan, E. H. und Appleton, T. C. (1969). Autoradiographic localization of ¹²⁵I-labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-2.
- Morgan, R. A. und Anderson, W. F. (1993). Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 62, 191-217.
- Mori, A., et al. (1991). Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett* 284, 263-6.
- Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 18, 119-28.

- Müller, K. (2000). Entwicklung und Charakterisierung eines liposomalen Hybridvektors zur antiangiogenen Gentherapie von Tumorerkrankungen. In Fachbereich Pharmazie (Marburg: Philipps-Universität Marburg).
- Müller, K., et al. (2001). Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles. *Cancer Gene Ther* 8, 107-17.
- Müller, R. H. und Hildebrand, G. E. (1998). Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, 2. Auflage Edition (Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).
- Mutschler, E. (1996). Arzneimittelwirkungen, Volume 7. Auflage: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft).
- Nahde, T. (2000). Entwicklung eines neuartigen liposomalen Vektors und zytoplasmatischen Expressionssystems für eine antiangiogene Gentherapie von Krebs. In Fachbereich Humanbiologie / Medizin (Marburg: Philipps-Universität Marburg).
- Nahde, T., et al. (2001). Combined transductional and transcriptional targeting of melanoma cells by artificial virus-like particles. *J Gene Med* 3, 353-61.
- Namba, Y. und Oku, N. (1993). Liposomal applications to cancer therapy. *J. Bioactive Compatible Polymers* 8, 158.
- Namba, Y., et al. (1990). Glucuronate-modified liposomes with prolonged circulation time. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38, 1663-6.
- Needham, D., et al. (1992). Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1108, 40-8.
- Neff, R. (1996). Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Adv. Drug Del. Rev.* 18, 343-347.
- Nettelbeck, D. M., et al. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet* 16, 174-81.
- Nettelbeck, D. M., et al. (2001). Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol Ther* 3, 882-91.
- New, R. R. C. (1989). Liposomes: a practical approach (Oxford: IRC Press).
- Niidome, T. und Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 9, 1647-52.
- Nishikawa, M. und Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12, 861-70.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-8.
- Ogris, M. und al., e. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* 6, 595-605.

- Ogris, M., et al. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 6, 595-605.
- Ogris, M. und Wagner, E. (2002). Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov Today* 7, 479-85.
- Oja, C. D., et al. (1996). Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim Biophys Acta* 1281, 31-7.
- Oku, N. und Namba, Y. (1994). Long-circulating liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11, 231-70.
- Olson, F., et al. (1982). Characterization, toxicity and therapeutic efficacy of adriamycin encapsulated in liposomes. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18, 167-175.
- Op den Kamp, J. A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 48, 47-71.
- Pandha, H. S., et al. (2000). Gene therapy: recent progress in the clinical oncology arena. *Curr Opin Mol Ther* 2, 362-75.
- Papac, R. J. (2001). Origins of Cancer Therapy. *Yale Journal of Biology and Medicine* 74, 391-398.
- Papahadjopoulos, D., et al. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11460-4.
- Papahadjopoulos, D., et al. (1973). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* 330, 8-26.
- Papahadjopoulos, D., et al. (1973). Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 311, 330-48.
- Papahadjopoulos, D., et al. (1972). Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature. *Biochim Biophys Acta* 266, 561-83.
- Papahadjopoulos, D. und Vail, W. J. (1978). Incorporation of macromolecules within large unilamellar vesicles (LUV). *Ann N Y Acad Sci* 308, 259-67.
- Papisov, M. I., et al. (1996). Underlying mechanisms of surface protection by molecular brushes: Models and reality. In *Twenty-third International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, pp. 681-682.
- Papisov, M. I., et al. (1995). Amplification of steric effects in cooperative systems. In *Twenty-second International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, pp. 442-443.
- Park, J. W. (2002). Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 4, 95-99.

- Park, Y. S. (2002). Tumor-directed targeting of liposomes. *Bioscience Reports* 22, 267-281.
- Parr, M. J., et al. (1997). Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol). *J Pharmacol Exp Ther* 280, 1319-27.
- Pasqualini, R., et al. (1997). Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol* 15, 542-6.
- Pasqualini, R., et al. (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol* 130, 1189-96.
- Patel, D. J. und Canuel, L. L. (1978). Anthracycline antitumor antibiotic nucleic-acid interactions. Structural aspects of the daunomycin poly(dA-dT) complex in solution. *Eur J Biochem* 90, 247-54.
- Patel, H. M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9, 39-90.
- Patel, H. M. und Moghimi, S. M. (1998). Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 32, 45-60.
- Patel, H. M., et al. (1983). Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochim Biophys Acta* 761, 142-51.
- Pawel von, J. (1997). Topotecan (Hycamtin(R))-Potent cytostatic action by selective topoisomerase I inhibition. *Onkologie* 20, 380-386.
- Pedroso de Lima, M. C., et al. (2003). Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Curr Med Chem* 10, 1221-31.
- Peng, K. W. (1999). Strategies for targeting therapeutic gene delivery. *Mol Med Today* 5, 448-53.
- Philipps, D., et al. (1988). Daunomycin-DNA dissociation kinetics. *Mol. Pharmacol.* 33, 225.
- Phillips, D. R., et al. (1978). The interaction of daunomycin with polydeoxynucleotides. *Eur J Biochem* 85, 487-92.
- Phillips, N. C. und Emili, A. (1991). Immunogenicity of immunoliposomes. *Immunol Lett* 30, 291-6.
- Plank, C., et al. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 7, 1437-46.
- Ponka, P. und Lok, C. N. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1111-37.

- Poste, G., et al. (1982). Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res* 42, 1412-22.
- Powis, G. (1987). Anthracycline metabolism and free radical formation. In *Metabolism and action of anti-cancer drugs*, G. Powis, ed. (London: Taylor, Francis), pp. 211.
- Price, P., et al. (1996). *Treatment of Cancer*, 3. Edition Edition (London: Chapman & Hall Medical).
- Qian, Z. M. und Tang, P. L. (1995). Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1269, 205-14.
- Rahman, A., et al. (1980). Liposomal protection of adriamycin-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Res* 40, 1532-7.
- Rak, J., et al. (1996). Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* 6, 3-18.
- Reynolds, P. N., et al. (2001). Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol* 19, 838-42.
- Richards, R. L., et al. (1986). Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochim Biophys Acta* 855, 223-30.
- Rigg, A. und Sikora, K. (1997). Genetic prodrug activation therapy. *Mol Med Today* 3, 359-66.
- Rinehart, J. J., et al. (1974). Adriamycin cardiotoxicity in man. *Ann Intern Med* 81, 475-8.
- Romero, E. L., et al. (1999). On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Lett* 448, 193-6.
- Roth, S. L. (1995). *Klinische Onkologie*, 1. Auflage Edition (Düsseldorf: Düsseldorfer Tumorzentrum).
- Rudolph, A. S., et al. (1996). Infusion of liposome encapsulated hemoglobin in normovolemic primates. *Artif. Cells Blood Subst. and Immobilization Biotechnol.* 24, 415.
- Saaristo, A., et al. (2000). Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 19, 6122-9.
- Saito, K., et al. (1988). Tissue distribution of sialo-glycopeptide bearing liposomes in rats. *Chem Pharm Bull* 36, 4187-4191.
- Sankaram, M. B. und Thompson, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* 29, 10670-5.
- Sauer, H. (1996). *Symptomorientierte Chemotherapie* (Stuttgart: Schattauer).
- Sauer, H. (1998). Systemische zytostatische Chemotherapie. *Onkologe* 2, 531-539.
- Savill, J., et al. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131-6.

- Schacter, L. (1996). Etoposide phosphate: what, why, where, and how? *Semin Oncol* 23, 1-7.
- Scherphof, G. L., et al. (2000). Liposome elimination by non-phagocytic cells of the liver. *J Liposome Res* 10, 431-442.
- Scherphof, G. L. und Kamps, J. A. (2001). The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Prog Lipid Res* 40, 149-66.
- Scherphof, G. L. und Kamps, J. A. A. M. (1998). Receptor versus non-receptor mediated clearance. *Advanced Drug Deliv* 32, 81-97.
- Schmidt, C. F., et al. (1977). A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems. *Biochemistry* 16, 2649-56.
- Schreier, H., et al. (1993). Artificial Viral Envelopes. In United States Patent.
- Schroit, A. J., et al. (1985). In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* 260, 5131-8.
- Science, N. Y. A. o. (1977). The use of liposomes in biology and medicine. In *The use of liposomes in biology and medicine: New York Academy of Science*.
- Scieszka, J. F., et al. (1991). Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharm Res* 8, 65-9.
- Scollay, R. (2001). Gene therapy: a brief overview of the past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 953, 26-30.
- Seeber, S. (1981). Molekulare, zelluläre und klinische Pharmakologie von Adriamcin. In *Beiträge zur Onkologie*, S. Seeber, ed.: Karger, S.), pp. 1-15.
- Seegenschmiedt, M., et al. (1998). Interdisziplinäre Dokumentation von akuten Nebenwirkungen in der Onkologie: Common Toxicity Criteria. *Forum* 13, 178-190.
- Seki, M., et al. (2002). p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 gene therapy of human prostate PC-3 carcinoma xenograft, using transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy. *Hum Gene Ther* 13, 761-73.
- Senior, J. und Gregoriadis, G. (1982). Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci* 30, 2123-36.
- Senir, J. H. (1987). Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3, 123-193.
- Sessa, G. und Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* 9, 310-8.
- Shah, M. A. und Schwartz, G. K. (2001). Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 7, 2168-81.

- Shahrokh, Z. und Nichols, A. V. (1982). Particle size interconversion of human low density lipoproteins during incubation of plasma with phosphatidylcholine vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 108, 888-95.
- Silversmith, R. E. und Nelsestuen, G. L. (1986). Assembly of the membrane attack complex of complement on small unilamellar phospholipid vesicles. *Biochemistry* 25, 852-60.
- Silversmith, R. E. und Nelsestuen, G. L. (1986). Interaction of complement proteins C5b-6 and C5b-7 with phospholipid vesicles: effects of phospholipid structural features. *Biochemistry* 25, 7717-25.
- Simoes, S., et al. (1998). Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. *Gene Ther* 5, 955-64.
- Simoes, S., et al. (1999). Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides. *J Leukoc Biol* 65, 270-9.
- Simon, A., et al. (1997). Clinical relevance of etoposide (VP-16) pharmacokinetics in children and adults. *Internatl. J. Pediat. Hematol/Oncol.* 4, 401-404.
- Smaby, J. M., et al. (1996). Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* 35, 5696-704.
- Sorgi, F. L., et al. (1997). Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther* 4, 961-8.
- Spack, E. G. und Sorgi, F. L. (2001). Developing non-viral DNA delivery systems for cancer and infectious disease. *Drug Discov Today* 6, 186-197.
- Spanjer, H. H., et al. (1986). Intrahepatic distribution of small unilamellar liposomes as a function of liposomal lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 863, 224-30.
- Storm, G. und Crommelin, D. J. A. (1998). Liposomes: quo vadis? *PSTT* 1, 19-31.
- Storm, G., et al. (1993). Tolerability of liposomes in vivo. In *Liposome Technology*, G. Gregoriadis, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 345-383.
- Storm, G., et al. (1988). Release of doxorubicin from peritoneal macrophages exposed in vivo to doxorubicin-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 965, 136.
- Sun, H., et al. (1999). Transferrin as a metal ion mediator. *Chem Rev* 99, 2817-42.
- Suzuki, S., et al. (1995). Cytotoxicity of anti-c-erbB-2 immunoliposomes containing doxorubicin on human cancer cells. *British J Cancer* 72, 663-668.
- Szebeni, J., et al. (1994). Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 255-63.
- Tarkkanen, A. und Haltia, M. (1980). Creutzfeld-Jakob disease. *Trans Ophthalmol Soc U K* 100, 151-4.

- Taylor, R. L., et al. (1982). Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 125, 610-611.
- Templeton, N. S. (2002). Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci Rep* 22, 283-95.
- Templeton, N. S. und Lasic, D. D. (1999). New directions in liposome gene delivery. *Mol Biotechnol* 11, 175-80.
- Thornton, S. C., et al. (1983). Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222, 623-5.
- Thornton, S. C., et al. (1983). Human endothelial cells: use of heparin in cloning long-term serial cultivation. *Science* 222, 623-625.
- Thorstensen, K. und Romslo, I. (1993). The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 215.
- Tollemar, J. und Ringden, O. (1995). Lipid formulations of amphotericin B. Less toxicity but at what economic cost? *Drug Saf* 13, 207-18.
- Treco, D. A. und Selden, R. F. (1995). Non-viral gene therapy. *Mol Med Today* 1, 314-21.
- Tros de Ilarduya, C., et al. (2002). Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *Biochim Biophys Acta* 1561, 209-21.
- Tros de Ilarduya, C. und Duzgunes, N. (2000). Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. *Biochim Biophys Acta* 1463, 333-42.
- Trowbridge, I. S. und Domingo, D. L. (1981). Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. *Nature* 294, 171-3.
- Tseng, W. C. und Huang, L. (1998). Liposome-based gene therapy. *Pharm Sci and Tech Today* 1, 206-213.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 22, 129-50.
- Uster, P., et al. (1998). Pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL, CAELYX) distribution in tumour models observed with confocal laser scanning microscopy. *Int. J. Pharm.* 162, 77-86.
- Vaage, J., et al. (1994). Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer* 73, 1478-84.
- Vaage, J., et al. (1993). Therapy of human ovarian carcinoma xenografts using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Cancer* 72, 3671-5.
- Vaage, J., et al. (1997). Tumour uptake of doxorubicin in polyethylene glycol-coated liposomes and therapeutic effect against a xenografted human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 75, 482-6.

- Vacik, J., et al. (1999). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther* 6, 1006-14.
- van Hoesel, Q. G., et al. (1984). Reduced cardiotoxicity and nephrotoxicity with preservation of antitumor activity of doxorubicin entrapped in stable liposomes in the LOU/M Wsl rat. *Cancer Res* 44, 3698-705.
- van Oss, C. J., et al. (1974). Phagocytosis-inhibiting properties of human serum alpha-1 acid glycoprotein. *Immunol Commun* 3, 321-8.
- van Tellingen, O., et al. (1993). Plasma pharmacokinetics of vinblastine and the investigational Vinca alkaloid N-(deacetyl-O-4-vinblastoyl-23)-L-ethyl isoleucinate in mice as determined by high-performance liquid chromatography. *Cancer Res* 53, 2061-5.
- Verma, I. M. und Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-42.
- Wagner, E. und al., e. (1994). Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. *Adv Drug Del Rev* 14, 113-136.
- Wagner, E., et al. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3410-4.
- WaksmanConference. (1974). Conference on Actinomycins: their potential for cancer chemotherapy.
- Wang, S. und Low, P. S. (1998). Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Control Release* 53, 39-48.
- Webb, M. S., et al. (1995). Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br J Cancer* 72, 896-904.
- Weiss, R. B., et al. (1986). Anthracycline analogs: the past, present, and future. *Cancer Chemother Pharmacol* 18, 185-97.
- Wetterau, J. R. und Jonas, A. (1983). Factors affecting the size of complexes of dipalmitoylphosphatidylcholine with human apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 258, 2637-43.
- Williams, K. J., et al. (1987). Phospholipid liposomes acquire apolipoprotein E in atherogenic plasma and block cholesterol loading of cultured macrophages. *J Clin Invest* 79, 1466-72.
- Williams, S. S., et al. (1993). Arrest of human lung tumor xenograft growth in severe combined immunodeficient mice using doxorubicin encapsulated in sterically stabilised liposomes. *Cancer Res* 53, 3964-3967.
- Wilmanns, W., et al. (2000). *Internistische Onkologie*, 2. Auflage Edition (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

- Wohlrab, W. und Lasch, J. (1989). The effect of liposomal incorporation of topically applied hydrocortisone on its serum concentration and urinary excretion. *Dermatol Monatsschr* 175, 348-52.
- Wolff, J. A., et al. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-8.
- Wu, N. Z., et al. (1993). Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res* 53, 3765-3770.
- Wu, Z. Y., et al. (1997). Melphalan dosing regimens for management of recurrent melanoma by isolated limb perfusion: application of a physiological pharmacokinetic model based on melphalan distribution in the isolated perfused rat hindlimb. *Melanoma Res* 7, 252-64.
- Xu, L., et al. (2002). Self-assembly of a virus-mimicking nanostructure system for efficient tumor-targeted gene delivery. *Hum Gene Ther* 13, 469-81.
- Xu, L., et al. (1997). Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiation in vitro. *Hum Gene Ther* 8, 467-75.
- Xu, L., et al. (2001). Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy. *J Control Release* 74, 115-28.
- Xu, L., et al. (1999). Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 10, 2941-52.
- Ye, S., et al. (1998). Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine. *Mol Med Today* 4, 431-7.
- Young, R. C., et al. (1981). The anthracycline anti-neoplastic drugs. *N Engl J Med* 305.
- Young, S. P., et al. (1984). The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem J* 219, 505-10.
- Yuan, F., et al. (1994). Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 54, 3352-3356.
- Zauner, W., et al. (1999). Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* 1428, 57-67.
- Zenke, M., et al. (1990). Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3655-9.
- Zhao, Y., et al. (1997). Functional interactions between monomers of the retroviral envelope protein complex. *J Virol* 71, 6967-72.
- Zhou, X. H., et al. (1991). Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1065, 8-14.

8. ANHANG

8.1. DATENTABELLEN

Lipide \ Liposomenart	AVE 3	AVE 5	AVE 6	AVE 9	AVE 11	AVE 13	AVE 14
Cholesterol	3,33	3,33	4,78	3,50	3,50		
POPC				3,21	2,88		
DPPC						3,33	
EPC			1,24				3,33
DLPE	3,33	3,33	1,18	1,47	1,47	3,33	3,33
DOPS	3,33		1,34		0,34		
DOPG		3,33				3,33	3,33
SM (milk)			1,46	1,82	1,82		

Die Angaben geben den jeweiligen Lipidanteil in μmol bei einem Ansatz mit 10 μmol Gesamtlipid pro ml

Tabelle 8.1. Liposomenzusammensetzung verschiedener AVE-Formulierungen

Lipide \ Liposomenart	AVE 9	AVE 9' (10% Chol)	AVE 9'' (20% Chol)	AVE 9''' (30% Chol)	AVE 9'''' (40% Chol)	AVE 9''''' (50% Chol)
Cholesterol	3,50	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
POPC	3,21	4,44	3,95	3,46	2,96	2,47
DPPC						
DLPE	1,47	2,04	1,81	1,58	1,36	1,13
DPPE						
N-Glut-PE						
SM (milk)	1,82	2,52	2,24	1,96	1,68	1,40
SSM						
DPPE-PEG 5000						

Die Angaben geben den jeweiligen Lipidanteil in μmol bei einem Ansatz mit 10 μmol Gesamtlipid pro ml an.

Tabelle 8.2. Liposomenzusammensetzung AVE9 Variationen Teil 1

Lipide \ Liposomenart	AVE 9	AVE 9 0% SM	AVE 9 5% SM	AVE 9 30% SM	AVE 9 0% PE	AVE 9 0% SM 5% PEG 5000	AVE 9 5% PEG 5000
Cholesterol	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,32	3,32
POPC	3,21	5,03	4,53	2,03	4,68	4,78	3,05
DPPC							
DLPE	1,47	1,47	1,47	1,47		1,40	1,40
DPPE							
N-Glut-PE							
SM (milk)	1,82		0,50	3,00	1,82		1,73
SSM							
DPPE-PEG 5000						0,5	0,5

Die Angaben geben den jeweiligen Lipidanteil in μmol bei einem Ansatz mit 10 μmol Gesamtlipid pro ml an.

Tabelle 8.3. Liposomenzusammensetzung AVE9 Variationen Teil 2

Lipide \ Liposomenart	AVE 9 DPPE	AVE 9 DPPC	AVE 9 SSM
Cholesterol	3,50	3,50	3,50
POPC	3,21		3,21
DPPC		3,21	
DLPE		1,47	1,47
DPPE	1,47		
N-Glut-PE			
SM (milk)	1,82	1,82	
SSM			1,82
DPPE-PEG 5000			

Die Angaben geben den jeweiligen Lipidanteil in μmol bei einem Ansatz mit 10 μmol Gesamtlipid pro ml an.

Tabelle 8.4. Liposomenzusammensetzung AVE9 Variationen Teil 3

Abkürzung	chemische Bezeichnung	Molekulargewicht	Hersteller
EPC	L- α -Phosphatidylcholin (aus Hühnerei isoliert)	760,09	Lipoid KG, Deutschland
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	734,05	Avanti Polar Lipids, AI, USA
POPC	1-Palmitoyl(D31)-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	760,09	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DLPE	1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin	579,76	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin	691,97	Avanti Polar Lipids, AI, USA
N-Glut-DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Glutaryl)	828,05	Avanti Polar Lipids, AI, USA
Rh-DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Lissamin Rhodamin B Sulfonyl)	1233,04	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DPPE-PEG5000	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglycol)-5000]	5745,04	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin	810,04	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DSPS	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin	814,07	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-rac-(1-glycerol)	797,04	Avanti Polar Lipids, AI, USA
Cholesterol	Cholesterol	386,7	Calbiochem, Ca, USA
Cholesteryl-oleoyl-Ether (H3)	[1 α ,2 α (n)-3H]Cholesteryl-oleoyl-ether		Amersham Biosciences Europe, Deutschland
Cholesteryl-Oleat (C14)	Cholesteryl[1-14C]oleat		Amersham Biosciences Europe, Deutschland
Sphingomyelin (Milch)	D-erythro-Sphingosylphosphorylcholin (isoliert aus Kuhmilch)	801,22	Avanti Polar Lipids, AI, USA
SSM	N-Stearoyl-D-erythro-Sphingosylphosphorylcholin	733,1	Avanti Polar Lipids, AI, USA
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (Hydrochlorid)	698,55	GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanamin		GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamin		GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland

Tabelle 8.5. Verwendete Lipide

		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Kontrolle	Mittelwert	35,6	90,2	148,8		330,8	474,5	681,0	
	Standardabweichung	23,3	32,5	34,4		69,6	129,0	235,0	
DOX	Mittelwert	25,8	46,7	82,1		211,9	260,1	311,4	
	Standardabweichung	20,4	31,8	52,5		176,4	182,2	172,5	
AVE9 35% DOX	Mittelwert	23,8	29,9	40,7		75,1	102,2	117,9	
	Standardabweichung	10,7	13,6	11,7		27,2	66,6	66,4	
AVE9 50% DOX	Mittelwert	31,9	54,0	122,4		218,0	244,9	280,9	
	Standardabweichung	20,2	34,7	57,5		127,4	118,8	119,6	

		Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14
Kontrolle	Mittelwert	330,8	474,5	681,0	893,6	1146,3		
	Standardabweichung	69,6	129,0	235,0	370,0	308,4		
DOX	Mittelwert	211,9	260,1	311,4	351,1	517,7	617,3	
	Standardabweichung	176,4	182,2	172,5	259,9	295,0	391,9	
AVE9 35% DOX	Mittelwert	75,1	102,2	117,9	121,6	181,6	235,5	481,5
	Standardabweichung	27,2	66,6	66,4	88,5	147,4	192,8	357,3
AVE9 50% DOX	Mittelwert	218,0	244,9	280,9	352,4	399,0	559,1	
	Standardabweichung	127,4	118,8	119,6	210,2	242,7	301,5	

Tabelle 8.6. Zu Abb. 3.28. (Therapeutische Wirkung von freiem Doxorubizin und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 35%Chol DOX und AVE9 50%Chol DOX im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe)

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Mittelwert	54,8	111,1	199,1	357,4	602,6	794,1
Standardabweichung	32,2	45,8	106,8	334,6	627,3	592,9
Mittelwert	37,0	85,6	173,0	375,9		550,4
Standardabweichung	15,8	13,1	43,4	136,5		185,1
Mittelwert	35,2	47,9	87,0	134,2	218,4	312,0
Standardabweichung	6,5	13,5	41,8	54,4	39,8	77,7
Mittelwert	43,5	53,4	88,1	146,4		184,4
Standardabweichung	19,9	21,7	20,6	117,6		170,5

	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
Mittelwert		985,4	1205,4	1521,8		
Standardabweichung		641,3	783,3	819,0		
Mittelwert	778,6	1001,0				
Standardabweichung	496,6	482,7				
Mittelwert		498,2	622,1	1090,3	1487,7	1569,7
Standardabweichung		69,5	86,2	522,0	796,6	885,7
Mittelwert	263,5	346,7	285,1	421,5		
Standardabweichung	206,9	298,0	262,8	231,2		

Tabelle 8.7. Zu Abb. 3.30. (Therapeutische Wirkung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX)

		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
AVE9 50% DOX	Mittelwert	25,2	34,5	48,1		95,4
	Standardabweichung	5,3	7,3	20,9		28,1
AVE9 50% DOX 0% SM	Mittelwert	29,5	81,5	158,6		260,6
	Standardabweichung	16,6	34,2	105,0		79,9
DOX	Mittelwert	25,6	104,4	191,7		267,4
	Standardabweichung	12,5	71,3	86,0		125,5

		Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
AVE9 50% DOX	Mittelwert	246,2	203,1	261,4	378,9	481,7
	Standardabweichung	141,7	113,5	133,1	207,7	352,7
AVE9 50% DOX 0% SM	Mittelwert	428,0	596,6	641,1	754,9	840,7
	Standardabweichung	247,6	400,2	444,8	453,4	593,0
DOX	Mittelwert	417,2	547,0	608,9	775,2	827,4
	Standardabweichung	237,5	386,3	344,4	447,2	428,7

Tabelle 8.8. Zu Abb. 3.32. (Therapeutische Wirkung von freiem und liposomalem Doxorubizin in Form der AVE9 50%Chol DOX und AVE9 50%Chol 0%SM DOX)

		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Kontrolle	Mittelwert	110,3	194,3	422,4	532,9	808,4	1032,6	1296,7
	Standardabweichung	42,8	127,9	415,4	485,8	714,7	708,5	841,2
AVE9 50%Chol DOX	Mittelwert	61,5	105,9	136,6	177,7	235,5	328,2	387,2
	Standardabweichung	11,0	49,9	63,0	75,2	105,4	135,8	203,6
DOXIL	Mittelwert	88,2	155,1	185,9	222,8	290,3	386,1	541,9
	Standardabweichung	24,7	63,4	84,5	84,9	105,1	138,2	142,0

		Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12
Kontrolle	Mittelwert	892,4	622,1	856,3	1020,2		
	Standardabweichung	657,6	617,3	840,4	974,9		
AVE9 50%Chol DOX	Mittelwert	425,5	459,8	517,8	742,1	567,5	614,0
	Standardabweichung	247,1	254,8	280,2	258,0	379,6	420,0
DOXIL	Mittelwert	604,8	661,2	795,2	627,1	476,1	502,6
	Standardabweichung	200,2	211,5	276,1	582,7	655,8	691,8

Tabelle 8.9. Zu Abb. 3.34. (Therapeutische Wirkung von AVE9 50%Chol DOX und DOXIL®)

8.2. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AVE	<i>artificial virus-like envelope</i>
AVP	<i>artificial virus-like particle</i>
bzw.	beziehungsweise
Chol	Cholesterol
D	DNA
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>acid</i>)
DOPE	Dioleoylphosphatidyl-Ethanolamin
DOPS	Dioleoylphosphatidyl-Serin
DOSPA	2,3-Dioleoyloxy-N-(2-(spermincarboxyamido)-ethyl)-N,N-Dimethyl-1-Propan-Ammonium-Chlorid
DOTAP	1,2-Dioleoyloxypropyl-3-N,N,N-trimethyl-Ammonium-Chlorid
DOTMA	N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethyl-Ammonium-Chlorid
DOX	Doxorubizin
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HP	humanes Plasma
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HUVEC	humane Nabelschnurvenenendothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)

i.d.	intradermal
i.v.	intravenös
k	kilo (10^3)
l	Liter
L	Lipid
lt.	laut
m	Meter
M	molar
μ	mikro (10^{-6})
min.	Minute
n	nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
opt	optimiert
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidyl-Cholin
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-(L)-Lysin
rad	radioaktiv
RGD	Arginin-Glyzin-Sparaginsäure (im Einbuchstabencode)
RLU	<i>relative light unit</i>
PrS	Protaminsulfat
PS	Phosphatidylserin
Rh	Rhodamin
s	Sekunde
s.	siehe
s.c.	subcutan
SM	Sphingomyelin
tf	Transferrin
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Die Abkürzungen aller verwendeten Lipide finden sich in der Tabelle 8.5. im Anhang 8.1. .

8.3. LEBENSLAUF

Name: Thomas Nahde
Geburtsdatum: 08.10.1974
Anschrift: Hauptstraße 23; 77839 Lichtenau
Geburtsort: Wilhelmshaven
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1981 - 1985 Grundschule Mühlenweg in Wilhelmshaven
1985 - 1987 Orientierungsstufe Schulzentrum Heppens in Wilhelmshaven
1987 - 1994 Gymnasium am Mühlenweg in Wilhelmshaven
Abschluß: Abitur

Universitätsausbildung:

1995 - 1997 Grundstudium Humanbiologie an der Philipps-Universität
Marburg

30.10.1997 Abschluß: Diplomvorprüfung

1997 - 1999 Hauptstudium Humanbiologie an der Philipps-Universität
Marburg

Hauptfach: Molekularbiologie

Nebenfächer: Zellbiologie, Immunologie

1999 - 2000 Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und
Tumorforschung der Philipps Universität Marburg in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Müller:
*"Entwicklung eines neuartigen liposomalen Vektors und
zytoplasmatischen Expressionssystems für eine antiangiogene
Gentherapie von Krebs"*

19.06.2000 Diplomhauptprüfung

04.07.2000 Abschluß: Diplom in Humanbiologie

2000 - 2003 Promotionsarbeit am Institut für Molekularbiologie und
Tumorforschung der Philipps Universität Marburg unter der
Betreuung von Prof. Dr. Rolf Müller:

*"Ein neues liposomales Trägersystem für eine optimierte
systemische Antitumorthherapie"*

8.4. AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Barth, Beato, Brüne, Brüsselbach, Elsässer, Feuser, Habermehl, Junclas, Koolmann, Kirchner, Knöller, Kontermann, Lammel, Lührmann, Mandrek, Müller, Mutters, Schulz, Schäfer, Seifart, K.-A. Seitz, J. Seitz, Sitter, Steinmetz, von Löw, Wagner, Waßmuth

8.5. DANKSAGUNG

Mein erster und besonderer Dank gilt *Herrn Prof. Dr. Müller* für die Überlassung dieses immer wieder motivierenden Promotionsthemas, den damit verbundenen Einstieg in die pharmazeutisch-biologische Forschung und Entwicklung sowie die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten bei der *vecron therapeutics AG*.

Insbesondere meiner Betreuerin *Dr. Sabine Müller-Brüsselbach*, die mich während der langjährigen Betreuung stets kompetent, engagiert und fröhlich und nicht ohne konstruktive Kritik unterstützt hat, gilt mein herzliches Dankeschön.

Bei *Andreas Graser* möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit, die schier unüberschaubare Anzahl verschiedener immer wieder optimisierbarer Liposomenformulierungen sowie die zahlreichen vergnüglichen Stunden außerhalb des Labors bedanken.

Herrn *Dr. "Rudi" Roland Kontermann* und seiner Frau *Dr. Elisete Pedrollo* danke ich "Theo" für zahlreiche fachliche und persönliche Diskussionen sowie seiner Abteilung links und rechts des Flurs, darunter insbesondere *Peter Hölig* und *Tina Völkel* für Nachhilfe bei der gelchromatographischen Säulenabtrennung und diversen Diskussionen beim Kaffee zwischendurch.

Die oft an den Nerven zehrende Arbeit mit zahlreichen Mäusen wurde durch die angenehme Zusammenarbeit mit der stets (!) fröhlichen *Anette Bust* und davor mit *Julia Dick* und auch *Tina Schrader* deutlich entspannter, wofür ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken möchte.

Tanja Hilka möchte ich an dieser Stelle ausdrücklich für die zahlreichen Doxorubizin-Formulierungen und HPLC-Analysen danken. Bei *Klaus Weber* bedanke ich mich für die Hilfe in allen Fragen zu Analytik und Proteingelen.

Allen Kollegen bei der vecron therapeutics AG möchte ich für die stets angenehme Zusammenarbeit danken.

Allen ehemaligen Laborkollegen des IMT, insbesondere denen des "big lab" - *Dr. Dagmar Heine, Dr. Dirk Nettelbeck* und *Dr. Wolf Graulich* - danke ich für die freundschaftliche und lustige Zusammenarbeit und viele bis heute unvergessene Erlebnisse.

Bedanken möchte ich mich zudem bei *Dr. Jürgen Adamkiewics* und *Bernhard Wilke* für die lebenswerte Unterstützung bei der Silberfärbung meiner SDS-Gele sowie die massenspektroskopische Identifikation der Apolipoproteine und jede Menge frischen Kaffee.

Meinen ehemaligen und erneuten Kollegen am IMT, darunter insbesondere natürlich einem bestimmten "*Frauenlabor*" gilt mein besonderer Dank, da ich hier auch während meiner Zeit bei der vectron therapeutics AG immer wieder herzlich aufgenommen wurde und viele fröhliche Stunden verbringen durfte. Ein großes Dankeschön geht in diesem Sinne auch an *Ulrike Schülke* für ihre kompetente und unkomplizierte Unterstützung bei allen Formalitäten bei der Promotion.

Bei all *meinen Freunden*, darunter insbesondere *Julia* und *Nikolai Wackerbarth* und *Holger Lenz*, die mich während der Promotionszeit in guten wie in schlechten Zeiten beraten, ertragen und stets unterstützt haben, möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken.

Meiner ganzen Familie, darunter insbesondere *meinen Eltern* und *meiner Freundin Julia*, möchte ich ganz besonders herzlich für ihre unermüdliche Ermutigung und Unterstützung während der letzten Jahre danken.

8.6. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Thomas Nahde, geboren am 08.10.1974 in Wilhelmshaven, ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: "Ein neues liposomales Trägersystem für die optimierte systemische Antitumorthherapie" im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die während der Promotion durchgeführten Arbeiten wurden in folgenden Fachartikeln veröffentlicht oder liegen zur Veröffentlichung bereit:

Müller, K., Nahde, T., Fahr, A., Müller, R. and Brüsselbach, S.

Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles
Cancer Gene Ther, 8(2), 107, 2001

Nahde, T., Müller, K., Fahr, A., Müller, R. and Brüsselbach, S.

Combined transductional and transcriptional targeting of melanoma cells by artificial virus-like particles
J Gene Med, 3(4), 353, 2001

Fahr, A., Müller, K., Nahde, T., Müller, R. and Brüsselbach, S.

A new colloidal lipidic system for gene therapy
J Liposome Res, 12(1-2), 37, 2002.

Hölig, P., Völkel, T., Bach, M., Nahde, T., Müller, R., Kontermann, R. E.

Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells
Zur Einreichung vorbereitet.